

**Use of a DNA sequence coding for a protein capable of degrading oxalic acid as selection gene**Patent Number:  US6187571

DOCUMENT # 12

Publication date: 2001-02-13

Inventor(s): GREZES-BESSET BRUNO (FR); GRISON REN EACUTE (FR); PIGNARD ANNIE (FR); SCHNEIDER MICHEL (FR)

Applicant(s): BIOGEMMA (US)

Requested

Patent:  WO9413790Application  
Number: US19950448398 19951024Priority Number  
(s): FR19920014721 19921207; WO1993FR01203 19931207

IPC

Classification: C12N15/09; C12N15/29; C12N5/10

EC Classification: C12N9/02B, C12N9/24, C12N15/82A8Equivalents: AU5653294, CA2151146, DE69332148D,  EP0672124 (WO9413790), B1

---

**Abstract**

---

The invention relates to the novel use of a sequence coding for a protein capable of degrading oxalic acid to select plant cells which have integrated a gene of interest, and a novel process for selecting, on oxalic acid, cells, calluses or plants transformed by this recombinant DNA

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - I2

---

See also document # 12

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE  
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>5</sup> : C12N 9/02, 9/24, 15/53, 15/56, 15/82 // 5/10, A01H 5/00, A01N 63/00		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 94/13790 (43) Date de publication internationale: 23 juin 1994 (23.06.94)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/01203 (22) Date de dépôt international: 7 décembre 1993 (07.12.93)		(81) Etats désignés: AU, CA, JP, NZ, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(30) Données relatives à la priorité: 92/14721 7 décembre 1992 (07.12.92) FR		Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>	
(71) Déposants ( <i>pour tous les Etats désignés sauf US</i> ): ELF SANOFI [FR/FR]; 32-34, rue Marbeuf, F-75008 Paris (FR). SOCIETE NATIONALE ELF AQUITAINE [FR/FR]; Tour Elf, 2, place de la Coupole, La Défense 6, F-92400 Courbevoie (FR).			
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants ( <i>US seulement</i> ): PIGNARD, Annie [FR/FR]; 3, rue du Canigou, F-31120 Roquetales (FR). GREZES-BESSET, Bruno [FR/FR]; 3, allée du Barcarès, F-31770 Colomiers (FR). GRISON, René [FR/FR]; 13, rue de Nauroze, F-31750 Escalquens (FR). SCHNEIDER, Michel [CH/FR]; 26, rue Montardy, F-31000 Toulouse (FR).			
(74) Mandataires: GILLARD, Marie-Louise etc.; Cabinet Beau de Loménie, 158, rue de l'Université, F-75340 Paris Cedex 07 (FR).			

(54) Title: USE OF A DNA SEQUENCE CODING FOR AN OXALIC ACID DEGRADING PROTEIN AS A SELECTION GENE

(54) Titre: UTILISATION D'UNE SEQUENCE D'ADN CODANT POUR UNE PROTEINE SUSCEPTIBLE DE DEGRADER L'ACIDE OXALIQUE A TITRE DE GENE DE SELECTION

(57) Abstract

A novel use of a sequence coding for an oxalic acid degrading protein in order to select plant cells incorporating a gene of interest, and a novel method for selecting, on oxalic acid, cells, calli or plants transformed by the recombinant DNA.

(57) Abrégé

L'invention concerne la nouvelle utilisation d'une séquence codant pour une protéine susceptible de dégrader l'acide oxalique pour sélectionner des cellules végétales ayant intégré un gène d'intérêt et un nouveau procédé pour sélectionner sur acide oxalique des cellules, des callus ou des plantes transformées par cet ADN recombinant.

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

Utilisation d'une séquence d'ADN codant pour une protéine susceptible de dégrader l'acide oxalique à titre de gène de sélection

L'invention concerne une nouvelle utilisation d'une séquence d'ADN codant pour une protéine susceptible de dégrader l'acide oxalique pour sélectionner des cellules végétales, en particulier des cellules végétales ayant intégré un gène d'intérêt et un nouveau procédé pour sélectionner sur acide oxalique des cellules, des cais ou des plantes transformés.

Depuis l'avènement des premières plantes transgéniques en 1983, le nombre de celles-ci a connu une croissance accélérée. Les vecteurs de transformation qui ont été développés à cette époque et qui sont toujours utilisés, tels que par exemple le vecteur pBIN19 (M. Bevan, 1984, Nucl. Ac. Res., 12, 8711-8721) font intervenir, comme gène de sélection des cellules végétales transformées, un gène de résistance à un antibiotique, la kanamycine. L'usage de ce mode de sélection, généralement facile à mettre en oeuvre, bon marché et applicable à de nombreuses espèces végétales, s'est très largement répandu dans les laboratoires de recherche.

Depuis que les premiers essais aux champs, donc hors confinement, de plantes transgéniques ont eu lieu en 1986, l'usage d'un gène de résistance à un antibiotique comme gène de sélection a fait l'objet de nombreuses critiques (cf. notamment F. Casse-Delbart et M. Tepfer, 1990, Biofutur, juin, 56-59 ainsi que J. Bryant et S. Leather, 1992, Tibtech, 10, 274-275). Le risque d'une transmission du gène de résistance de la plante transgénique à une bactérie du sol et, par la suite, à une bactérie potentiellement pathogène pour l'homme, bien qu'étant à priori très faible et encore jamais mis en évidence, n'est pas à négliger (J.A. Heinemann, 1991, TIG, 7, 181-185).

De nombreux substituts au gène de résistance à la kanamycine ont été proposés (M.Ratner, 1989, Bio-Technology, 7, 337-341) mais la plupart font intervenir, soit une résistance à un autre antibiotique (telle que par exemple la gentamycine, la streptomycine, le méthotréxate ou l'hygromycine), soit une résistance à un herbicide (tels que par exemple le bromoxynil ou la phosphinothricine), ce qui soulève des objections semblables. Une autre approche proposée a été l'élimination après usage du gène de résistance grâce à un système de recombinaison homologue (E.C.Dale et D.W.Ow, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 10558-10562). Ce système, appelé système cre/lox, présente toutefois le

désavantage de nécessiter une transformation ultérieure des plantes transgéniques pour y introduire le gène cre responsable de la recombinaison, suivie d'une autofécondation des plantes afin de pouvoir faire ségrégner dans les descendances ce gène cre du gène d'intérêt. Il n'est donc pas simple à utiliser. De plus, ce système laisse présent dans les plantes transgéniques une copie des séquences lox, lesquelles ne présentent aucun intérêt agronomique.

L'invention propose, comme gène de sélection des plantes transgéniques, un gène codant pour une protéine susceptible de dégrader l'acide oxalique, phytotoxine produite par de nombreuses espèces de champignons. Ce gène de sélection qui reste dans les plantes transgéniques présente un intérêt agronomique car il a un effet phytoprotecteur vis-à-vis de ces champignons.

L'invention concerne donc l'utilisation d'une séquence d'ADN codant pour une protéine susceptible de dégrader l'acide oxalique à titre de gène de sélection de cellules végétales.

La protéine susceptible de dégrader l'acide oxalique peut être une enzyme à activité décarboxylase, telle que notamment l'oxalate décarboxylase d'*Aspergillus* ou de *Collybia velutipes* ou de préférence une enzyme à activité oxydase, telle que par exemple l'oxalate oxydase d'orge (commercialisée par Boehringer, réf. 567 698), de sorgho (Chandra S. Pundier, 1991, Phytochemistry, 30, 4, p. 1065) ou de mousse [*Mnium menziesii*] (M.F. Laker et al, 1980, Clinical Chemistry, 26, 7, 827).

25 Une protéine à activité oxalate oxydase particulièrement appréciée est la protéine de séquence [SEQ ID N°11] :

Glu Leu Asp Val Ala Glu Trp Pro Gly Thr Asn Thr Leu Gly Val Ser  
85 90 95  
Met Asn Arg Val Asp Phe Ala Pro Gly Gly Thr Asn Pro Pro His Ile  
100 105 110  
5 His Pro Arg Ala Thr Glu Ile Gly Ile Val Met Lys Gly Glu Leu Leu  
115 120 125  
Val Gly Ile Leu Gly Ser Leu Asp Ser Gly Asn Lys Leu Tyr Ser Arg  
130 135 140  
Val Val Arg Ala Gly Glu Thr Phe Leu Ile Pro Arg Gly Leu Met His  
10 145 150 155 160  
Phe Gln Phe Asn Val Gly Lys Thr Glu Ala Ser Met Val Val Ser Phe  
165 170 175  
Asn Ser Gln Asn Pro Gly Ile Val Phe Val Pro Leu Thr Leu Phe Gly  
180 185 190  
15 Ser Asn Pro Pro Ile Pro Thr Pro Val Leu Thr Lys Ala Leu Arg Val  
195 200 205  
Glu Ala Arg Val Val Glu Leu Leu Lys Ser Lys Phe Ala Ala Gly Phe  
210 215 220

20 ou de séquence présentant un degré d'homologie élevé avec la séquence [SEQ ID N°1].

La séquence [SEQ ID N°1] est celle de la germine de blé, protéine induite pendant la germination du blé, dont la séquence a été décrite par E. Dratewka-Kos, 25 1989, J. Biol. Chem., 264, 4896–4900 et B.G. Lane, 1991, J. Biol. Chem., 266, 10461–10469.

Un degré d'homologie élevé signifie ici une homologie (rapport entre les acides aminés identiques et le nombre total d'acides aminés) d'au moins 80 % des 30 séquences d'acides aminés, lorsqu'elles sont alignées d'après l'homologie maximale, selon la méthode d'alignement optimal des séquences de Needleman et Wunsch, 1970, J. Mol. Biol., 48, 443–453. Cette méthode est notamment utilisée dans le logiciel UWGCG de l'Université du Wisconsin : Devereux et al., 1984, Nucl. Ac. Res., 12, 387–395 – option GAP.

35

Un exemple de protéine présentant un degré d'homologie élevé avec la séquence [SEQ ID N°1] est celle de l'oxalate oxydase d'orge dont la séquence est décrite dans la demande de brevet WO 92/14824 (cette séquence présente une

homologie de 96 % avec la séquence [SEQ ID N°1]), ou celle d'autres oxalate oxydases de céréales proches du blé.

Compte tenu de la dégénérescence du code génétique il existe un grand  
5 nombre de séquences nucléotidiques codant pour l'oxalate oxydase de séquence  
[SEQ ID N°1]. Parmi celles-ci on apprécie particulièrement la séquence [SEQ ID  
N°2]

	ATGGGGTACT CCAAAACCT AGTAGCTGGC CTGTTCGCAA TGCTGTACT AGCTCCGGCC	60
10	GTCTTGGCCA CCGACCCAGA CCCTCTCCAG GACTTCTGTG TCGCCGACCT CGACGGCAAG	120
	GCGGTCTCGG TGAACGGGCA CACGTGCAAG CCCATGTCGG AGGCCGGCGA CGACTTCCTC	180
	TTCTCGTCCA AGTTGGCCAA GGCCCCAAC ACGTCCACCC CGAACGGCTC CGCCGTGACG	240
	GAGCTCGACG TGGCCGAGTG GCCCCGGTACC AACACGCTGG GTGTGTCCAT GAACCCGCTG	300
	GACTTTGCTC CCGGAGGCAC CAACCCACCA CACATCCACC CGCGTGCCAC CGAGATCGGC	360
15	ATCGTGATGA AAGGTGAGCT TCTCGTGGGA ATCCTTGGCA GCCTCGACTC CGGGAACAAG	420
	CTCTACTCGA GGGTGGTGCG CGCCGGAGAG ACGTTCTCA TCCCACGGGG CCTCATGCAC	480
	TTCCAGTTCA ACGTCGGTAA GACCGAGGCC TCCATGGTCG TCTCCCTCAA CAGCCAGAAC	540
	CCCGGCATTG TCTTCGTGCC CCTCACGCTC TTGGCTCCA ACCCGCCCCAT CCCAACGCCG	600
	GTGCTCACCA AGGCACTCCG GGTGGAGGCC AGGGTCGTGG AACTTCTCAA GTCCAAGTTT	660
20	GCCGCTGGGT TT	672

Selon une variante de l'invention, la séquence d'ADN codant pour une protéine susceptible de dégrader l'acide oxalique peut être utilisée en combinaison avec une séquence d'intérêt.

25

Ainsi selon cette variante, l'invention concerne l'utilisation de la séquence d'ADN codant pour une protéine susceptible de dégrader l'acide oxalique pour sélectionner des cellules végétales transformées avec une séquence d'intérêt, la transformation étant réalisée soit à l'aide de deux vecteurs distincts portant l'un la séquence d'ADN codant pour une protéine susceptible de dégrader l'acide oxalique, l'autre la séquence d'intérêt, soit avec un seul vecteur contenant les deux séquences ci-dessus, ce vecteur étant ci-après dénommé ADN recombinant.

La séquence d'intérêt est toute séquence d'ADN procurant un avantage aux cellules végétales lorsqu'elle est intégrée dans leur génome. Elle peut être par exemple une séquence régulatrice avantageuse. Elle peut être aussi une séquence codant pour une protéine d'intérêt ou pour un précurseur de cette dernière.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, la séquence d'intérêt confère aux plantes une résistance aux agents pathogènes, tels que les champignons, les bactéries, ainsi que les arthropodes, notamment les insectes et les nématodes.

5

Une telle séquence d'intérêt peut être par exemple une séquence codant pour une protéine à activité endochitinase ou pour un précurseur de cette dernière. On sait en effet, comme décrit dans la demande de brevet WO 92/01792, qu'une telle protéine a un effet phytoprotecteur car elle est capable de dégrader la chitine, polymère polysaccharidique constitué d'unités N-acétyl-glucosamine associées par des liaisons  $\beta$ -1,4, qui est un composé structural important de la paroi de la plupart des champignons pathogènes, de l'exosquelette des arthropodes, en particulier des insectes, et de l'enveloppe externe des œufs et des cystes de nématodes.

10

Une séquence intéressante codant pour une protéine à activité endochitinase ou pour un précurseur de cette dernière, est celle décrite dans la demande de brevet WO 92/01792, qui code pour une protéine comprenant la séquence [SEQ ID N°3] ; cette séquence [SEQ ID N°3] correspond à la séquence [SEQ ID N°1] de la demande WO 92/01792.

15

On apprécie particulièrement que cette séquence code pour un précurseur d'une protéine à activité endochitinase, qui comprend, en amont de la séquence [SEQ ID N°3], le peptide signal de séquence [SEQ ID N°4] ; ce peptide-signal correspond au peptide signal ayant la séquence [SEQ ID N°3] décrite dans la demande WO 92/01792.

20

Il est alors avantageux que le peptide signal de séquence [SEQ ID N°4] soit séparé de la protéine à activité chitinase de séquence [SEQ ID N°3], par le peptide de séquence [SEQ ID N°5] ; ce peptide correspond au peptide ayant la séquence [SEQ ID N°2] décrite dans la demande WO 92/01792.

25

Parmi les nombreuses séquences nucléotidiques qui codent pour un précurseur de la protéine de séquence [SEQ ID N°3] comprenant en amont de celle-ci le peptide signal de séquence [SEQ ID N°4], séparé de la protéine de séquence [SEQ ID N°3] par le peptide de séquence [SEQ ID N°5], la séquence d'ADN [SEQ ID N°6] est particulièrement préférée. Cette séquence, qui correspond à la séquence SEQ ID N°4 décrite dans la demande WO 92/01792, comporte deux introns en position 443-521 et en position 676-756

Une autre séquence codant pour une protéine à activité endochitinase ou pour un précurseur de cette dernière est celle de la chitinase d'*Aphanocladium album* décrite dans la demande EP-A1-531 218 qui comprend la séquence [SEQ ID N°7]. Cette séquence correspond à la séquence [SEQ ID N°1] de la demande EP-A1-531 218.

On apprécie particulièrement que cette séquence code pour un précurseur d'une protéine à activité endochitinase, qui comprend, en amont de la séquence [SEQ ID N°7], le peptide signal de séquence [SEQ ID N°8]. Ce peptide signal correspond au peptide signal ayant la séquence [SEQ ID N°4] de la demande EP-A1-531 218.

Il est alors avantageux que le peptide signal de séquence [SEQ ID N°8] soit séparé de la protéine à activité chitinase de séquence [SEQ ID N°7], par le peptide de séquence [SEQ ID N°9]. Ce peptide correspond au peptide ayant la séquence [SEQ ID N°5] décrite dans la demande EP-A1-531 218.

Parmi les nombreuses séquences nucléotidiques qui codent pour la protéine de séquence [SEQ ID N°7], une séquence particulièrement appréciée est la séquence d'ADN [SEQ ID N°10] qui correspond à la séquence [SEQ ID N°6] décrite dans la demande EP-A1-531 218.

Une autre séquence d'intérêt intéressante qui confère aux plantes une résistance aux agents pathogènes est celle qui code pour une protéine à activité  $\beta$ -1,3-glucanase ou pour un précurseur de cette dernière. On sait en effet, comme décrit dans la demande de brevet WO-92 16632, qu'une telle protéine a un effet phytoprotecteur car elle est capable de dégrader les  $\beta$ -1,3-glucanes, polymères polysaccharidiques constitués d'unités glucose associées par des liaisons  $\beta$ -1,3 présentant parfois des ramifications de type  $\beta$ -1,4 ou  $\beta$ -1,6, qui sont un composé structural important de la paroi de la plupart des champignons, et notamment des champignons phytopathogènes.

Une telle séquence avantageuse est celle décrite dans la demande de brevet WO 92/16 632, qui code pour une protéine comprenant la séquence [SEQ ID N° 11]. Cette séquence correspond à la séquence (a<sub>1</sub>) décrite dans la demande WO 92/16 632.

Il est intéressant que cette séquence d'intérêt comprenne, immédiatement en aval de la séquence codant pour la séquence [SEQ ID N° 11], la séquence [SEQ ID N° 12] éventuellement tronquée dans sa partie carboxy-terminale de 0 à 27 acides aminés. Cette séquence [SEQ ID N° 12] correspond à la séquence (a<sub>4</sub>) décrite dans  
5 la demande WO 92/16 632.

Cette séquence d'intérêt comprend alors de préférence, immédiatement en amont de la séquence codant pour la séquence [SEQ ID N° 11], un codon CAA ou CAG codant pour Gln.

10

Une séquence de ce type particulièrement appréciée est celle codant pour une protéine à activité  $\beta$ -1,3-glucanase ou un précurseur de cette dernière qui comprend la séquence [SEQ ID N° 13]. Cette séquence correspond à la séquence (a<sub>5</sub>) décrite dans la demande WO 92/16 632.

15

On apprécie particulièrement que cette séquence code pour un précurseur d'une protéine à activité  $\beta$ -1,3-glucanase qui comprend en amont de la séquence [SEQ ID N° 13], le peptide signal de séquence [SEQ ID N° 14]. Ce peptide signal correspond au peptide signal ayant la séquence (a<sub>2</sub>) décrite dans la demande  
20 WO 92/16 632.

25

Parmi les nombreuses séquences nucléotidiques qui codent pour la protéine de séquence [SEQ ID N° 13], une séquence avantageuse est la séquence d'ADN [SEQ ID N° 15] qui correspond à la séquence (Na<sub>1</sub>) décrite dans la demande  
WO 92/16 632.

30

L'ADN recombinant défini ci-dessus, comprenant le gène codant pour l'oxalate oxydase flanqué des signaux nécessaires à son expression ainsi qu'une séquence d'intérêt, est introduit dans les cellules végétales à transformer. Lorsque la séquence d'intérêt code pour une protéine ou un précurseur de celle-ci, elle comprend également les signaux nécessaires à son expression. La construction contenant ces séquences peut être réalisée dans un vecteur unique ou dans des vecteurs différents qui seront utilisés pour la transformation.

35

Le promoteur est de préférence un promoteur constitutif fort, par exemple le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur, ou un promoteur commandant une expression tissu ou organe spécifique comme le promoteur de la petite sous-unité de la ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase-oxygénase qui

s'exprime préférentiellement dans les feuilles et tout particulièrement les tissus du mésophylle (Kuhlemeier et al., 1987, Ann. Rev. Plant Physiol, 38, 221-257). On peut également utiliser un promoteur spécifique commandant par exemple une expression dans les graines ou au cours d'un stade précis du développement de la

5 plante, ou un promoteur inductible à la suite d'un choc thermique, d'une blessure ou de l'interaction entre la plante et des parasites (Kuhlemeier et al., 1987, référence citée ci-dessus), si une expression de l'ADN recombinant est recherchée dans ces situations.

10 On utilise la séquence terminatrice, comportant des sites de polyadénylation, pouvant être isolée de gènes végétaux ou de gènes s'exprimant dans les végétaux, comme par exemple le terminateur du gène de la nopaline synthase d'Agrobacterium tumefaciens.

15 Une bactérie, par exemple de l'espèce Escherichia coli, qui contient l'ADN recombinant défini ci-dessus avec les moyens permettant sa réPLICATION peut servir au clonage de cet ADN recombinant et une bactérie susceptible d'infecter une plante avec transfert de matériel génétique, par exemple de l'une des espèces Agrobacterium rhizogenes et Agrobacterium tumefaciens, qui contient cet ADN

20 dans un contexte permettant sa réPLICATION peut servir à transformer des cellules végétales. La transformation des cellules végétales par l'ADN recombinant ci-dessus peut également être effectuée par une autre méthode biologique telle que la voie du tube pollinique (Zhong-xun Luo et al., Plant Molec. Biol. Rep., 1988, 6, 165-176), la transformation directe de graines en germination (Toepfer R. et al., 1989, The Plant Cell., 1, 133-139), ou par une méthode physique telle que l'utilisation de polyéthylèneglycol, de l'électroporation (Chistou P. et al., 1987, Proc. Ntl. Acad. Sci. USA, 84, 3662-3699) ou du bombardement à l'aide de microparticules (Klein T.M. et al., 1988, Proc. Ntl. Acad. Sci. USA, 85, 8502-8505).

25 30 L'invention concerne donc également une cellule végétale, caractérisée en ce qu'elle est transformée par l'ADN recombinant défini précédemment, avec les moyens nécessaires à l'expression de la protéine susceptible de dégrader l'acide oxalique et de la protéine d'intérêt ou du précurseur de cette dernière; une telle cellule peut être sélectionnée sur un milieu contenant de l'acide oxalique. Cette

35 cellule végétale peut provenir d'une espèce de grande culture, telle que par exemple le maïs, le soja, la betterave, le blé, l'orge, le pavot, le colza, le tournesol, la luzerne et le sorgho, d'une espèce florale, telle que le rosier, l'oeillet, le gerbera ou d'une espèce potagère, telle que la carotte, la tomate, la salade, la chicorée, le poivron, le

melon et le chou. Des espèces particulièrement appréciées sont le colza Brassica napus, le tournesol Helianthus annuus et le tabac Nicotiana tabacum.

L'étape de transformation qui concerne une ou plusieurs cellules est suivie

5 d'une étape de multiplication de ces cellules transformées de façon à obtenir des cais, lesquels peuvent donner naissance à des plantes transformées par des processus d'organogénèse ou d'embryogénèse.

L'invention concerne donc aussi une plante ou une partie de plante,

10 caractérisée en ce qu'elle contient l'ADN recombinant défini précédemment, avec les moyens nécessaires à l'expression du gène codant pour la protéine susceptible de dégrader l'acide oxalique et du gène codant pour la protéine d'intérêt ou du précurseur de cette dernière et en ce qu'elle a été sélectionnée sur un milieu contenant de l'acide oxalique. Une partie de plante particulièrement appréciée est la

15 partie apte à former une nouvelle plante complète, notamment après semis, enfouissement ou repiquage, ou à produire des semences. Une telle partie est par exemple un grain, une graine, une semence, une bouture, une marcotte. Ces plantes peuvent être plus particulièrement des espèces Nicotiana tabacum, Helianthus annuus et Brassica napus.

20

La protéine susceptible de dégrader l'acide oxalique peut être une enzyme à activité décarboxylase, telle que notamment l'oxalate décarboxylase d'Aspergillus ou de Collybia velutipes ou de préférence une enzyme à activité oxydase, telle que par exemple l'oxalate oxydase d'orge (commercialisée par Boehringer, réf. 567 698),

25 de sorgho (Chandra S. Pundier, 1991, Phytochemistry, 30, 4, p. 1065) ou de mousse (Mnium menziesii) (M.F. Laker et al, 1980, Clinical Chemistry, 26, 7, 827). Une protéine à activité oxalate oxydase particulièrement appréciée est la protéine de séquence [SEQ ID N°1], ou une séquence présentant un degré d'homologie élevé avec la séquence [SEQ ID N°1]. Celle-ci est avantageusement codée par la

30 séquence d'ADN [SEQ ID N°3].

L'acide oxalique est une phytotoxine produite par de nombreux champignons pathogènes, tels que notamment Sclerotinia sclerotiorum (B. Grezes-Besset, 1988, Thèse de Doctorat, Université Paul Sabatier, Toulouse, ainsi que G. Goday et al, 1990, Physiological and Molecular Plant Pathology, 37, 179-191), Sclerotium rolfsii (D.F. Bateman et al, 1965, Phytopathology, 68, 1597-1599), Aspergillus niger (I.A.S. Gibson, 1953, Transactions British Mycological Society, 36, 198-209),

Cristulariella pyramidalis (P. Kurian et la, 1979, *Phytopathology*, 69, 712-714) et Cryphonectria parasitica (A.R. Bennett et al, 1990, *Mycologia*, 358-363).

5 L'invention a également trait à un procédé pour sélectionner sur acide oxalique des cellules, des cals ou des plantes transformées par un ADN recombinant défini précédemment, caractérisé en ce que, dans le milieu de sélection, le calcium est sous forme soluble.

10 Les plantes peuvent provenir d'une espèce de grande culture, telle que par exemple le maïs, le soja, la betterave, le blé, l'orge, le pavot, le colza, le tournesol, la luzerne et le sorgho, d'une espèce florale, telle que le rosier, l'oeillet, le gerbera ou d'une espèce potagère, telle que la carotte, la tomate, la salade, la chicorée, le poivron, le melon et le chou. Des espèces particulièrement appréciées sont le colza Brassica napus, le tournesol Helianthus annuus et le tabac Nicotiana tabacum.

15

Le milieu de sélection comprend de l'acide oxalique et tous les éléments nécessaires à la multiplication et la différentiation des cellules végétales et notamment du calcium indispensable pour leur développement, qui doit donc rester disponible. En présence d'acide oxalique le calcium a tendance à s'associer à ce dernier pour former un sel d'oxalate insoluble, ce qui le rend indisponible pour les cellules végétales. Il est donc nécessaire que le milieu de sélection contienne des agents permettant de garder le calcium sous forme soluble.

25 De préférence ces agents sont des agents chelateurs ayant une affinité pour le calcium supérieure à celle de l'acide oxalique. Ceux-ci doivent bien sûr, de plus, ne pas être toxiques pour les cellules.

30 Des exemples d'agents chelateurs ayant une affinité pour le calcium supérieure à celle de l'acide oxalique sont l'EDTA et l'EGTA. Dans le cas du tournesol, l'EGTA est un agent chelateur particulièrement apprécié.

Ainsi selon un autre aspect, l'invention a pour objet un procédé pour sélectionner sur acide oxalique des cals ou des plantes transformées par une séquence d'ADN codant pour une protéine susceptible de dégrader l'acide oxalique, 35 qui consiste à cultiver les cals ou les plantes sur un milieu contenant de l'acide oxalique et du calcium en présence d'un agent chelateur ayant une affinité pour le calcium supérieure à celle de l'acide oxalique.

Selon une variante préférée, les plantes sont transformées avec une séquence d'ADN codant pour une protéine susceptible de dégrader l'acide oxalique associée à une séquence d'intérêt telle que définie précédemment, en particulier une séquence codant pour une protéine d'intérêt.

5

L'invention sera mieux comprise à l'aide de l'exposé ci-après, divisé en sections, qui comprend des résultats expérimentaux et une discussion de ceux-ci. Certaines de ces sections concernent des expériences effectuées dans le but de réaliser l'invention, d'autres des exemples de réalisation de l'invention, donnés bien 10 sûr à titre purement illustratif.

Dans cette partie expérimentale on utilise le clone gf-2.8 de la germe de blé décrite par B.G. Lane et al, 1991, J. Biol. Chem., 226- 10461-10469 ; la 15 séquence de l'ADN génomique de ce clone est la séquence [SEQ ID N°16] et la séquence peptidique traduite est la séquence [SEQ ID N° 17].

Une grande partie de l'ensemble des techniques ci-après, bien connues de l'homme de l'art, est exposée en détail dans les ouvrages de Sambrook et al : "Molecular Cloning : a Laboratory Manual", publié en 1989 par les éditions Cold 20 Spring Harbor Press à New-York (2ème édition), et dans l'ouvrage de Gelvin et al: "Plant Molecular Biology Manual", publié en 1988 par les éditions Kluwer Academics.

**SECTION 1 : Purification et caractérisation partielle de l'oxalate oxydase  
25 d'orge**

**1) Purification de l'oxalate oxydase d'orge**

Une oxalate oxydase d'orge a été purifiée jusqu'à homogénéité à partir d'une 30 préparation commerciale enrichie en activité oxalate oxydase (Boehringer, ref 567 698) préparée à partir de grains d'orge en germination. La protéine est purifiée selon le protocole décrit ci-après :

Etape 1 :

35

La préparation commerciale lyophilisée est solubilisée dans l'eau puis équilibrée dans un tampon acétate 10mM de pH 5,2 par passage dans une mini-colonne à base de Sephadex G25 prête à l'emploi (NAP 10-Pharmacia). Cet extrait

est fractionné par chromatographie sur une colonne d'échange d'ions à base de polymère synthétique (colonne Mono S HR5/5 de Pharmacia). Après dépôt de l'échantillon, les protéines non retenues sont éluées par le tampon acétate de sodium 10mM de pH 5,2. Les protéines retenues sur la colonne sont éluées par un 5 gradient linéaire de 10 à 500mM de tampon acétate de sodium de pH 5,2.

L'éluat est analysé en ligne par son absorbance à 280 nm et les fractions collectées sont caractérisées : teneur en protéines mesurée par la technique colorimétrique de Bradford (1976, Anal. Biochem., 72 , 248-252), activité oxalate 10 oxydase mesurée selon la technique de Suguira et al., 1979, Chem. Pharm. Bull. , 79 , 2003-2007, décrite au point 2) ci-après. Chaque fraction est caractérisée, après électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS) et coloration à l'argent, par sa mobilité électrophorétique comparée à des protéines de référence.

15 Etape 2 :

Les fractions présentant une activité oxalate oxydase et éluées à une concentration d'acétate de sodium comprise entre 200mM et 275mM sont rassemblées puis concentrées par centrifugation sur un système Centricon-10 20 (Amicon-réf. 4205). L'extrait est ensuite fractionné par chromatographie d'exclusion sur une colonne Superdex 75 (Pharmacia). Les fractions collectées sont analysées selon les méthodes décrites à l'étape 1.

A l'issue de la purification, on obtient une protéine unique, qui présente une 25 activité oxalate oxydase, d'un poids moléculaire apparent de  $26 \pm 3$  kDa (poids moléculaire déterminé après électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 15 % en présence de SDS et révélation à l'argent).

30 2) Mesure de l'activité oxalate oxydase

L'activité oxalate oxydase est mesurée d'après la méthode décrite par Suguira et al. ,1979, Chem. Pharm. Bull. , 79 , 2003-2007, et résumée ci-après. L'extrait enzymatique est incubé en présence de 75  $\mu$ l d'oxalate de sodium (à 0,18 % dans du tampon succinate 100mM de pH 4,0) et de tampon succinate 100mM de 35 pH 4,0, en quantité suffisante pour avoir un volume de mélange réactionnel égal à 1,5 ml.

Après 10 minutes d'incubation du mélange réactionnel à 37°C, on ajoute successivement 100 µl de tampon Tris 1 M de pH 8,9, puis 1 ml de réactif préparé extemporanément et constitué de : 8 mg de 4-aminoantipyrine, 6 mg de peroxydase de raifort (Sigma, ref P8250), 80 µl de diméthylaniline préparés dans  
5 100 ml de tampon phosphate 0,1 M de pH 7,0.

L'activité enzymatique est estimée par la mesure spectrophotométrique de l'absorbance à 530 nm. Elle est exprimée en unité d'oxalate oxydase/mg de protéine (Une unité d'oxalate oxydase (U oxox) est la quantité d'enzyme qui convertit 1  
10 10<sup>-6</sup> mole d'oxalate en peroxyde d'hydrogène en 1 minute à 37°C et à pH 3,8)

### 3) Caractérisation de la protéine purifiée

#### a) Préparation d'anticorps polyclonaux

15

25 µg de la protéine d'orge purifiée jusqu'à homogénéité et ayant une activité oxalate oxydase sont injectés à un lapin dans 500 µl d'adjuvant complet de Freund (Sigma, ref F5881)

20

Trois injections de rappel de 25 µg dans l'adjuvant incomplet de Freund (500 µl) (Sigma, ref F5506) ont été réalisées à 3 semaines d'intervalle. L'immunsérum a été prélevé 3 semaines après la dernière injection.

Cet immunsérum reconnaît spécifiquement l'oxalate oxydase. Il permet de  
25 révéler cette protéine par la technique de Western blot (décrise dans la Section 2 4)  
b) à partir d'un extrait de protéines totales d'embryons d'orge en germination.

#### b) Détermination de la séquence partielle de l'oxalate oxydase

30

Un échantillon de la protéine de 26 ± 3kDa ayant une activité oxalate oxydase est traité au bromure de cyanogène et les oligopeptides libérés sont séparés par HPLC phase inverse sur une colonne C4 Brownlee. La séquence N-terminale de la protéine ainsi que celle d'un peptide interne sont déterminées grâce à un séquenceur de protéines (Modèle 470A, Applied Biosystems, USA) équipé d'un chromatographe (Modèle 120A, Applied Biosystems) qui analyse en continu les dérivés phénylthiohydantoïques formés après chaque cycle de dégradation.

La séquence aminoterminal déterminée est la [SEQ ID N° 18] suivante :

5      Thr Asp Pro Asp Pro Leu Gln Asp Phe Xaa Val Ala Asp Leu Asp Gly  
Lys Ala Val Ser Val Asn Gly His Thr Xaa Lys Pro Met Ser Glu Ala  
Gly Asp Asp Phe Leu Phe

Xaa étant un acide aminé non déterminé.

La séquence d'un peptide interne est la séquence [SEQ ID N° 19] suivante :

10     Ala Gly Glu Thr Phe Val Ile Pro Arg

Après comparaison avec la banque des séquences protéiques connues (banque Swiss-Prot) en utilisant l'option GAP du logiciel UWGCG de l'Université du Wisconsin : Devereux et al., 1984, Nucl. Acids Res., 12 , 387-395, une homologie d'au moins 94 % est trouvée avec la séquence d'une protéine de blé induite au cours de la germination, la germine, décrite par Lane et al, 1991 J. Biol. Chem., 226, 10461-10469.

20    **SECTION 2 : Transformation du tabac par le gène de la germine de blé, sélection sur acide oxalique des cals et des plantes transgéniques**

25    1) Construction d'un vecteur de transformation

a) Préparation de la séquence codant pour la germine de blé

Le fragment d'ADN HindIII - SphI de 745 paires de bases du clone gf-2.8 décrit par B.G. Lane et al, (1991, J. Biol. Chem., 226, 10461-10469) portant la 30 séquence codant pour la germine de blé a été purifié par électrophorèse sur gel d'agarose suivie par une extraction au moyen du kit "Geneclean" (Bio 101, ref 3105) selon le protocole du fabricant. Ce fragment comporte 19 paires de bases en amont de l'ATG initiateur ainsi que 54 paires de bases en aval du codon stop. Ce fragment a été inséré à l'aide de l'ADN ligase T4 entre les sites HindIII et SphI du site de 35 clonage multiple d'un vecteur pTZ19R (commercialisé par Pharmacia), dont le site BamHI a été détruit par remplissage grâce à la polymérase de Klenow, selon les méthodes bien connues de l'homme de l'art. Le plasmide ainsi créé est appelé plasmide pPH096. Le site HindIII présent dans ce plasmide est ensuite ouvert, et un

nouveau site BamHI recréé par l'adjonction d'un oligonucléotide de séquence suivante [SEQ ID N°20] : AGCTGGATCC

Le vecteur obtenu, appelé plasmide pPH098, est cloné dans la souche E.  
5 coli JM 109 (Clontech). Après vérification de la séquence nucléotidique du fragment cloné, la partie codante est repurifiée sous la forme du fragment de restriction BamHI-SacI de 789 paires de bases. Ce fragment contient la séquence codant pour le peptide signal, ainsi que celle codant pour la germe mature tels qu'ils sont décrits par B. Lane et al, 1991, J. Biol. Chem., 226, 10461-10469.

10

b) Préparation de la séquence promotrice comprenant le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur

A partir du plasmide pBI121 (Clontech) par coupure à l'aide des endonucléases HindIII et BamHI, puis électrophorèse sur gel d'agarose, le fragment HindIII-BamHI d'environ 900 paires de bases, contenant le promoteur 35S du virus de la mosaïque de chou-fleur, est isolé. Ce fragment est recoupé par HindIII. Le fragment d'environ 410 paires de bases, portant le site BamHI, est traité par l'ADN ligase T4 en présence d'un linker HindIII (séquence synthétique contenant un site HindIII). Après coupure par l'endonucléase HindIII et électrophorèse sur gel d'agarose, le fragment HindIII-BamHI résultant, d'environ 420 paires de bases, est isolé et purifié.

25

c) Préparation de la séquence terminatrice comprenant le terminateur du gène de la nopaline synthase (NOS)  
d'Agrobacterium tumefaciens

A partir du plasmide pBI121 (Clontech), par coupure à l'aide des enzymes de restriction SacI et EcoRI, puis électrophorèse sur gel d'agarose, un fragment de 250 paires de bases environ, renfermant le terminateur du gène de la nopaline synthase, a été isolé.

d) Clonage dans le vecteur binaire pBIN19

35 On a ligué à l'aide de l'ADN ligase T4 la séquence promotrice (cf. ci-dessus 1) b)), la séquence codant pour la germe (cf. ci-dessus 1) a)) et la séquence terminatrice (cf. ci-dessus 1) c)), dans le vecteur binaire pBIN19 (Bevan, 1984, Nucl. Acid Res., 12, 8711-8721), ouvert à l'aide des endonucléases HindIII et

EcoRI. Ce vecteur porte deux gènes de résistance à la kanamycine, l'un pouvant s'exprimer dans les bactéries, l'autre situé immédiatement en amont du gène recombinant complet pouvant être transféré aux cellules végétales. Ce gène de résistance à la kanamycine servira à vérifier que les plantules régénérées obtenues 5 après sélection sur acide oxalique à l'aide du gène codant pour l'oxalate oxydase sont effectivement transformées.

Le vecteur obtenu, appelé pPH100, est cloné dans la souche *E. coli* HB 101 (Clontech).

10

## 2) Transformation d'*Agrobacterium tumefaciens*

La transformation est réalisée selon la méthode de congélation-décongélation décrite dans Plant Molecular Biology Manual (Gelvin et al, op. cité) et 15 résumée ci-après.

Des cellules compétentes d'*Agrobacterium tumefaciens* (souche LBA 4404, Clontech) sont préparées par refroidissement rapide dans la glace d'une culture en phase exponentielle de croissance. Les bactéries sont alors remises en suspension 20 dans une solution de CaCl<sub>2</sub> 20mM. Des parties aliquotes de cette suspension sont distribuées dans des tubes Eppendorf, puis congelées dans l'azote liquide.

1 µg de plasmide pPH100 est ajouté aux cellules congelées, contenues dans un tube Eppendorf. La suspension est ensuite incubée à 37°C pendant 5 min ; 1 ml 25 de milieu Luria (Gibco) est alors rajouté et le tube est incubé à 28°C pendant 4 h. Des parties aliquotes sont étalées sur des boîtes de Pétri contenant un milieu minimum gélosé, décrit dans Plant Molecular Biology Manual (op. cité), en présence de 100 mg de rifampicine et 25 mg/l de kanamycine. Dans ces conditions, seules poussent les colonies d'*Agrobacterium tumefaciens* ayant intégré le plasmide 30 pPH100. Celles-ci contiennent le gène chimérique dans un contexte permettant sa répllication.

La résistance aux deux antibiotiques des colonies sélectionnées est vérifiée en repiquant celles-ci sur le même milieu de sélection deux fois de suite. La 35 présence du gène chimérique associant le promoteur 35S à la partie codante de la germe de blé dans *Agrobacterium tumefaciens* est vérifiée par la méthode de Southern Blot sur une préparation d'ADN total (lyse des cellules, purification de l'ADN par extraction à l'aide du mélange phénol/chloroforme, selon le protocole

décrit par Gelvin dans l'ouvrage cité ci-dessus, coupure de l'ADN purifié à l'aide d'enzymes de restriction, électrophorèse sur gel d'agarose, transfert sur membrane et hybridation, selon les techniques bien connues de l'homme de l'art).

5        3) Transformation du tabac

Du tabac *Nicotiana tabacum* cultivé in vitro a été infecté par *Agrobacterium tumefaciens* contenant le plasmide pPH100 selon la procédure de Horsch et al., bien connue de l'homme du métier (Horsch R.B. et al., 1985 Science 227, 1229-10 1231), dont les principales étapes sont exposées ci-après.

Des disques de feuilles de plantes axéniques de tabac *Nicotiana tabacum* (variété Wisconsin Havana 38) sont incubés dans une culture d'*A. tumefaciens* hébergeant le plasmide pPH100. Les disques égouttés sur papier Whatman sont mis en culture sur des milieux de culture en boîtes de Pétri afin de multiplier les cellules transformées de façon à obtenir des cals. Ces cals sont ensuite transférés sur du milieu contenant de la céfotaxime à 500 µg/ml destinée à décontaminer les tissus végétaux (élimination des *Agrobacterium tumefaciens*) et de la kanamycine à 100 µg/ml pour sélectionner le matériel transgénique. Des pousses transformées se développent à partir de ces cals ; les plantes qui en sont issues sont transférées en serres.

25        4) Mise en évidence de l'expression du gène de la germine dans le tabac transgénique

a) Préparation des extraits de protéines de tabacs transformés et de tabacs témoins

Les fragments de tissus (cals et feuilles de plantes) ont été congelés dans 30 l'azote liquide, réduits en poudre et stockés à -20°C.

Pour la réalisation d'électrophorèses, l'oxalate oxydase est extraite directement à partir de la poudre végétale par le tampon de charge de Laemmli (référence ci-dessous).

Pour les dosages d'activité oxalate oxydase, l'extrait enzymatique est réalisé par mise en suspension de la poudre végétale dans un tampon succinate 0,05M, pH 4.

5 Pour les dosages de protéines, l'extrait végétal, en suspension dans le tampon succinate ci-dessus, est centrifugé à 10 000 g pendant 5 min.

La concentration des protéines totales est déterminée sur les surnageants, appelés ci-après les extraits bruts de protéines, en suivant la technique de Bradford  
10 (Bradford M.M., 1976, Anal. Biochem., 72, 248-254).

b) Immunodétection de l'oxalate oxydase (Western blot) dans des cals et dans des plantes

15 On soumet les extraits bruts de protéines à un Western blot, technique bien connue de l'homme de l'art et décrite par H. Towbin et al., Proc. Ntl. Acad. Sci. USA, 76, 1979, 4350-4354, qui comprend les étapes suivantes :

20 • dénaturation par chauffage à 100°C pendant 10 min dans un tampon, dénommé tampon de charge, constitué de Tris 0,125 M, pH 6,8, SDS 4 %, bleu de bromophénol 0,002 %, glycérol 20 %, β-mercaptopéthanol 10 % (selon le protocole décrit par Laemmli U. K., 1970, Nature, 227, 680-685), suivie d'une centrifugation à 10 000 g ;

25 • séparation électrophorétique des différentes protéines contenues dans le solubilisat selon le protocole décrit par Laemmli (réf. ci-dessus) ;

30 • électrotransfert desdites protéines contenues dans le gel sur une membrane en PVDF (selon la technique de H. Towbin et al., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 4350-4354).

L'immunodétection est réalisée selon un protocole qui comprend les étapes suivantes :

35 • saturation de la membrane PVDF(fluorure de polyvinylidène) sur laquelle les protéines ont été transférées par incubation pendant au minimum 2 h à 37°C dans une solution de gélatine à 3 % dans du tampon phosphate salin contenant 0,05 % de détergent Tween 20.

5

- incubation (pendant 1 h à 37°C) en présence de l'immunsérum préparé précédemment (contenant les anticorps polyclonaux reconnaissant la protéine recombinante), dilué au 1/10 000 dans du tampon phosphate salin.

10 Le complexe antigène-anticorps est ensuite révélé à l'aide d'un système streptavidine-biotine conjugué à la phosphatase alcaline avec le kit RPN 23 d'Amersham ("Blotting detection kit"), utilisé selon les indications du fabricant.

15 L'empreinte obtenue montre, pour les cals et pour les feuilles de plantes de tabac transformées par le plasmide pH100, la présence d'une protéine de poids moléculaire apparent d'environ  $26 \pm 3\text{kDa}$ , reconnue par les anticorps polyclonaux préparés dans la section 1 3)a) et absente des cals et des feuilles de plantes de tabac témoins. Cette protéine a le même poids moléculaire apparent que l'oxalate oxydase purifiée obtenue dans la Section 1.

20 c) Mise en évidence de l'activité oxalate oxydase de la germe de blé exprimée dans du tabac

25 L'activité oxalate oxydase de 6 extraits de cals et de feuilles de plantes de tabac transformées par le plasmide pH100 est mesurée selon la méthode de Sugira et al., décrite Section 1. Les résultats sont regroupés dans le Tableau I ci-après :

Tableau I : Activité oxalate oxydase mesurée dans différents tabacs transgéniques

N° de l'échantillon	Témoin	Cals						Feuilles	
		Transgéniques						Témoin	Transgénique
W38		2	26	65	81	86		W 38	400
Activité (U oxox/ml d'extrait)	1,0	10,5	10,1	16,0	2,8	3,0	0,0		5,4

30

W38 = tabac témoin non transformé

On constate à la lecture du tableau ci-dessus que le tabac transgénique (cals ou feuilles) présente une activité oxalate oxydase significativement supérieure à celle du tabac témoin.

5        5) Sélection sur acide oxalique des régénérand

a) Protocole de sélection

Des disques de feuilles de plantes axéniques de tabac Nicotiana tabacum 10 (variété Wisconsin Havana 38) sont incubés dans une culture d'A. tumefaciens hébergeant le plasmide pPH100. Les disques égouttés sur papier Whatman sont mis en culture sur des milieux de culture en boîtes de Pétri afin de multiplier les cellules transformées de façon à obtenir des cals. Après trois jours, les disques de feuilles sont rincés dans de l'éthanol 80 % puis dans du milieu gélosé de Murashige 15 et Skoog (1962, Physiol. Plant. 15, 473) contenant 500 µg/ml de cefotaxime. Ils sont ensuite transférés sur un milieu contenant de l'acide oxalique afin de sélectionner les amas cellulaires exprimant l'oxalate oxydase.

b) Mode de préparation des milieux de culture

20

L'acide oxalique s'associant au calcium pour former un sel d'oxalate de calcium insoluble, le milieu de sélection doit être préparé selon un protocole permettant de conserver le calcium sous une forme soluble utilisable par les cellules végétales malgré la présence d'acide oxalique.

25

Préparation de la solution A :

Pour chaque concentration, 50 ml d'une solution d'acide oxalique concentrée 20 fois par rapport à la concentration finale attendue, sont ajustés à pH 5,8 avec 30 une solution d'hydroxyde de potassium (KOH) 3M. La solution est ajustée à 100 ml avec de l'eau désionisée, stérilisée par filtration sur filtre de 0,45 µm, puis maintenue à une température de 50°C jusqu'à son utilisation.

Préparation de la solution B :

35

258 mg d'EGTA (acide éthylène glycol-bis(β-amino ethyl ether) N,N,N',N'-tetraacétique) (Sigma, ref. E. 4378) sont mis en solution dans 100 ml d'eau désionisée. L'EGTA est solubilisé en ajustant le pH à 10,0 avec une solution de

KOH 10 M. 100 mg de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  sont ensuite ajoutés et le pH de la solution est ajusté à 5,8 avec une solution HCl 2M. Le volume est ajusté à 150 ml puis la solution est stérilisée par passage sur filtre de 0,45  $\mu\text{m}$ .

5        Incorporation du calcium et de l'oxalate au milieu de culture :

750 ml de milieu de culture gélosé de Murashige et Skoog (1962, Physiol. Plant. 15, 473) sans chlorure de calcium, concentré 1,33 fois, sont autoclavés pendant 20 min à 120°C. La température est ensuite abaissée à 50°C et les 10 solutions A et B incorporées dans ce milieu. Après homogénéisation de la solution, le milieu est coulé dans des boîtes de Pétri.

c) Détermination de la dose d'acide oxalique à utiliser pour la sélection

15

Une gamme de sensibilité à l'acide oxalique de cals de tabac non transgénique (variété Wisconsin Havana 38) a été établie. Les milieux de culture ont été préparés selon le protocole décrit ci-dessus. Pour chaque concentration d'acide oxalique, 4 boîtes contenant 25 cals de diamètre de 2 mm et d'un poids moyen de 20 10 mg ont été mis en culture. Les résultats, exprimés en % d'inhibition de croissance pondérale par rapport aux cals témoins, sont présentés dans le tableau II ci-après :

25        Tableau II : Inhibition de la croissance pondérale de cals de tabac par l'acide oxalique

Conc. Ac oxalique ( $\mu\text{g/ml}$ )	0	40	60	80	120	180	270
Inhib. croissance pondérale	0 %	0 %	12 %	19 %	51 %	89 %	99 %

Compte tenu des résultats ci-dessus, la dose de sélection choisie est de 270  $\mu\text{g/ml}$  (3mM).

30

d) Utilisation du gène codant pour l'oxalate oxydase comme gène de sélection des transformants

Après transformation et induction de la callogénèse, les disques foliaires de 35 tabac sont transférés sur un milieu contenant 270  $\mu\text{g/ml}$  d'acide oxalique. A cette concentration, les cals exprimant l'oxalate oxydase ne présentent pas une

croissance différente du témoin poussant sur un milieu dépourvu d'acide oxalique et sont capables de survivre et de produire des plantes transgéniques. Le fait que les plantules régénérées sont bien transgéniques est vérifié par leur résistance à la kanamycine (second gène de sélection porté par le plasmide pH100). Sur 29  
5 plantes sélectionnées sur acide oxalique, 28 sont également résistantes à la kanamycine.

La sélection sur l'acide oxalique a donc permis de sélectionner les cals transformants ainsi que les plantes transgéniques.

10

### **SECTION 3 : Transformation du tournesol par le gène de la germe de blé, sélection sur acide oxalique des cals**

15

#### 1) Transformation du tournesol

Obtention de cals de tournesol transformés

Des graines de tournesol immatures sont prélevées sur le capitule de plantes de tournesol de la lignée HA89 bien connue, étudiée notamment par P.J. Goyne et al., Journal Article n° 1534 of the North Dakota State Univ. Agric. Exp. Stn. Fargo ND-58105 et par M.F. Geriani, Plant Cell Physiol, 33, 2, 157-164. Ces graines sont stérilisées en surface pendant 30 min dans une solution d'hypochlorite de calcium à 2 %, puis rincées à l'eau distillée stérile.

25

Les embryons immatures sont prélevés sur ces graines et mis en culture sur le milieu I (tableau III) pendant 14 jours à 25°C et à l'obscurité. Ces embryons sont ensuite cultivés pendant 10 jours sur le milieu II à 25°C sous une photopériode de 16 h jour / 8 h nuit.

30

Les embryons sont alors coupés en deux au niveau de l'axe embryonnaire et mis à tremper pendant 10 min dans une suspension d'Agrobacterium tumefaciens contenant le vecteur binaire pH100 (cf. sections 2.1 et 2.2). Cette suspension est obtenue par culture de cette bactérie pendant 15 h dans le milieu Luria liquide.

35

Les embryons sont ensuite égouttés sur du papier filtre stérile, puis remis en culture sur le milieu II à l'obscurité pendant 3 jours. Les embryons sont alors brièvement rincés par du milieu Murashige et Skoog liquide (Murashige et Skoog,

1962, Physiol. Plant 15 : 473) contenant 500 mg/l de l'antibiotique cefotaxime. Ils sont ensuite égouttés sur du papier filtre stérile et mis en culture sur du milieu III contenant 250 mg/l de cefotaxime, 250 mg/l de carbenicilline et 50 mg/l de paromomycine. Cette culture s'effectue à 25°C sous une photopériode de 16 h jour / 8 h nuit ; les tissus végétaux ainsi que les calcs se développant à leur surface sont repiqués tous les 21 jours sur ce même milieu.

5

Tableau III : Composition des différents milieux utilisés pour l'obtention de plantes de tournesol transformées

Composition mg/l	Milieux	I	II	III
KNO <sub>3</sub>		2500	2500	1900
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>		-	-	1650
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O		150	150	440
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O		250	250	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		-	-	170
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		134	134	-
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O		150	150	-
MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O		10	10	-
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O		2	2	8,6
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>		3	3	6,2
KI		0,75	0,75	0,83
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O		0,025	0,025	0,025
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O		0,25	0,25	0,25
CaCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O		0,025	0,025	0,025
Mn SO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O		-	-	22,3
Na <sub>2</sub> EDTA		37,3	37,3	37,3
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O		27,8	27,8	27,8
Acide nicotinique		1	1	0,5
Thiamine HCl		10	10	0,1
Pyridoxine HCl		1	1	0,1
Myo-inositol		4000	4000	100
L-alanine		1000	1000	-
L-glutamine		800	800	-
L-serine		160	160	-
L-tryptophane		50	50	-
L-cystéine		10	10	-

Tableau III : suite

Milieux Composition mg/l	I	II	III
Ca-D-panthoténate	-	-	0,8
Acide folique	-	-	0,1
Chlorure de choline	-	-	0,1
Acide 4-aminobenzoïque	-	-	0,05
Riboflavine	-	-	0,05
Saccharose	120 000	60 000	30 000
Acide 2,4-dichlorophenoxy acétique	2	-	-
6-Benzylaminopurine	-	0,4	-
Kinétine	-	-	1
Agar	7000	7000	7000
pH	5.7	5.8	5.7

2) Mise en évidence de l'expression du gène de la germine dans le tournesol transgénique

5

a) Préparation des extraits protéiques

Se fait d'une manière identique à celle décrite dans la Section 2 4)a).

10

b) Immunodétection de l'oxalate oxydase (Western blot) dans des cals

L'immunodétection, effectuée selon le protocole décrit dans la Section 2 4)b), met en évidence, dans des cals et des feuilles de tournesol transformé par le plasmide pPH100, la présence d'une protéine surabondante de poids moléculaire apparent d'environ  $26 \pm 3$  kDa. Cette protéine, absente des cals et des feuilles de plantes témoins, a le même poids moléculaire apparent que l'oxalate oxydase purifiée obtenue dans la Section 1.

c) Activité oxalate oxydase de la germe de blé exprimée dans du tournesol

L'activité oxalate oxydase de 5 extraits de protéines de cals de tournesol transformés par le plasmide pPH100 est mesurée selon la méthode de Sugira et al., décrite Section 1. Les résultats montrent une activité oxalate oxydase significativement supérieure à celle de l'extrait témoin.

Tableau IV : Activité oxalate oxydase de cals de tournesol transgéniques

10

N° du cal	Témoin non transformé	17	18	19	20	21
Unité Ox Ox/mg prot/min	0,0	9,5	0,7	0,8	0,6	1,4

3) Sélection sur acide oxalique des cals transgéniques

La sélection des cals transgéniques est réalisée en cultivant le matériel végétal issu du milieu III (cf. ci-dessus 1) sur un milieu Murashige et Skoog de sélection préparé selon le protocole décrit dans la Section 2 5)b).

La détermination de la dose de sélection à appliquer au cours de la culture de cals de tournesol se fait selon la méthode décrite dans la Section 2 5)c), cette méthode étant appliquée à des cals non transgéniques de tournesol obtenus à partir d'embryons immatures. Les résultats sont présentés dans le tableau V :

Tableau V : Inhibition de la croissance pondérale du tournesol par l'acide oxalique

25

La dose d'acide oxalique permettant de réaliser la sélection est de 270 µg/ml (3mM). A cette concentration, les cals exprimant l'oxalate oxydase ne présentent pas d'inhibition de croissance.

**SECTION 4 : Utilisation de la sélection sur acide oxalique pour obtenir des plantes transgéniques exprimant un gène d'intérêt, codant, par exemple, pour une protéine à activité endochitinase.**

5        1) Construction du vecteur de transformation

a) Préparation du fragment portant le gène codant pour l'oxalate oxydase

10        Le fragment HindIII - EcoRI de 1420 pb environ du plasmide pPH100 décrit dans la section 2 d) est purifié et recloné dans un vecteur pUC19 selon les méthodes bien connues de l'homme de l'art. Ce plasmide est ensuite linéarisé grâce à l'endonucléase de restriction EcoRI et l'extrémité cohésive est remplie au moyen du fragment de Klenow. Puis, après coupure par l'endonucléase HindIII, le fragment  
15        HindIII - extrémité franche est purifié.

b) Préparation du fragment portant un gène hybride codant pour une protéine à activité endochitinase

20        Le fragment HindIII - EcoRI provenant du plasmide pBR1 décrit dans la demande de brevet de WO 92/01792 exemple 1 et contenant un gène chimérique codant pour une protéine à activité endochitinase qui comprend le promoteur 35 S, une séquence codant pour une chitinase hybride tomate-tabac et le terminateur NOS est purifié, recloné dans le vecteur pUC19, puis le site HindIII est détruit d'une  
25        manière classique. Le fragment extrémité franche - EcoRI est purifié.

c) Préparation d'un vecteur de transformation des plantes ne comportant pas de gène de résistance à la kanamycine

30        Le fragment NheI - HindIII comprenant la partie codant pour le gène de résistance à la kanamycine est éliminé du T-DNA du plasmide pBIN19 (cf Section 2 1 d). L'utilisation, selon les méthodes bien connues de l'homme de l'art, des oligonucléotides CTAGCA et AGCTTG permet de recirculer le plasmide en recréant les sites de restriction NheI et HindIII. Le plasmide résultant est ensuite  
35        linéarisé par les endonucléases de restriction HindIII et EcoRI;

d) Assemblage du vecteur de transformation

On a ligué à l'aide de l'ADN ligase T4 le gène codant pour l'oxalate oxydase obtenu en a) ci-dessus) et le gène chimérique codant pour une protéine à activité chitinase (obtenu en b) ci-dessus) dans un vecteur binaire pBIN19 dans lequel on a éliminé le gène de résistance à la kanamycine s'exprimant dans les plantes (obtenu en c) ci-dessus).

5

Le vecteur obtenu, appelé pH 106, est cloné dans la souche E.Coli HB 101  
10 (Clontech)

2) Transformation d'*Agrobacterium tumefaciens*

La transformation est réalisée selon la méthode décrite dans la section 2 2).

15

3) Transformation du tabac

Du tabac Nicotiana tabacum cultivé in vitro est infecté par Agrobacterium tumefaciens contenant le plasmide pH106 selon la procédure de Horsch et al., bien connue de l'homme du métier (Horsch R.B. et al., 1985 Science 227, 1229-1231), dont les principales étapes sont exposées ci-après.

20

Des disques de feuilles de plantes axéniques de tabac Nicotiana tabacum (variété Wisconsin Havana 38) sont incubés dans une culture d'A. tumefaciens hébergeant le plasmide pH106. Les disques égouttés sur papier Whatman sont mis en culture sur des milieux de culture en boîtes de Pétri afin de multiplier les cellules transformées de façon à obtenir des calis. Après 48 heures, les disques sont rincés dans de l'éthanol 80 % puis dans du milieu gélosé de Murashige et Skoog (1962, Physiol. Plant. 15, 473) contenant 500 µg/ml de céfotaxime. Ils sont ensuite transférés pour 3 jours sur du milieu contenant de la céfotaxime à 500 µg/ml destinée à décontaminer les tissus végétaux (élimination des Agrobacterium tumefaciens).

25

30

4) Sélection sur acide oxalique des régénérants

Après transformation et induction de la callogénèse, les disques foliaires de tabac sont transférés sur un milieu contenant 270 µg/ml d'acide oxalique préparé 5 selon la méthode décrite dans la section 2 5)b). Seuls les cals transgéniques exprimant le gène de l'oxalate oxydase, donc capables de dégrader l'acide oxalique, sont capables de survivre et de produire des plantes transgéniques.

10 5) Mise en évidence de l'expression de la protéine à activité endochitinase dans les tabacs transgéniques sélectionnés sur acide oxalique

a) Préparation des extraits bruts de protéines de tabac transformé

Cette préparation est effectuée selon la méthode décrite dans la section 2  
15 4)a)

b) Mise en évidence de la chitinase hybride par immuno-empreinte  
(Western blot)

20 On soumet les extraits bruts de protéines à un Western blot, technique bien connue de l'homme de l'art et décrite par H. Towbin et al., Proc. Ntl. Acad. Sci. USA, 76, 1979, 4350–4354, qui comprend notamment les étapes mentionnées dans la section 2.4)b)

25 L'immunodétection de la protéine d'intérêt se réalise grâce à un immunosérum contenant des anticorps polyclonaux reconnaissant la protéine hybride à activité chitinase (cf. WO 92/01792 exemple 5).

30 Le complexe antigène-anticorps est ensuite révélé à l'aide d'un système streptavidine-biotine conjugué à la phosphatase alcaline avec le kit RPN 23 d'Amersham ("Blotting detection kit"), utilisé selon les indications du fabricant.

35 L'empreinte obtenue montre, pour les feuilles de plantes de tabac transformées par le plasmide pPH106, la présence d'une protéine de poids moléculaire apparent d'environ  $26 \pm 6$  kDa reconnue par les anticorps polyclonaux et absente des feuilles des plantes de tabac témoins. Cette protéine a le même poids moléculaire apparent que la protéine hybride à activité chitinase décrite dans la demande WO 92/01792.

c) Mise en évidence de l'activité chitinolytique de la protéine recombinante

5 L'activité chitinolytique des extraits bruts de protéines de feuilles de 5 plantes de tabac transformé par le plasmide pPH 106 (plantes n° 463, 464, 465, 468 et 469) et d'extrait brut de protéines de feuilles de plantes de tabac non transformé (plante W 38) est mesurée selon la méthode suivante :

10 L'activité endochitinase de la protéine est mesurée par une méthode radiochimique permettant d'estimer la quantité de monomères ou d'oligomères libérés par l'enzyme à partir d'un substrat (la chitine tritiée). Cette méthode, décrite par Molano et al. (1977, Anal. Biochem., 83, 648-656), est résumée ci-après.

15 A un volume d'extrait protéique de 10 µl sont ajoutés 50 µl d'une suspension de chitine tritiée d'activité spécifique 0,58 MBq/ml. Le volume final est ajusté à 300 µl avec du tampon d'acétate de sodium 0,2 M de pH 5,0. Après 90 min d'incubation à 30°C, la réaction d'hydrolyse de la chitine est arrêtée par 100 µl d'acide trichloracétique à 20 %. Les tubes réactionnels sont ensuite centrifugés pendant 10 min à 12 000 g. Une partie aliquote de 100 µl du surnageant renfermant les oligomères solubles de chitine est prélevée et la radioactivité correspondante est mesurée par scintillation liquide en présence de 5 ml de mélange scintillant. On exprime l'activité chitinolytique spécifique en dpm/µg de protéine.

20 Pour les 5 plantes sélectionnées sur acide oxalique, on obtient les valeurs suivantes :

genotype	W 38	463	464	465	468	469
Activité spécifique DPM/µg prot	95	149	348	318	301	320

(W 38 = tabac témoin non transformé)

On constate sur le tableau ci-dessus que les extraits de plantes de tabac transformé par le plasmide pPH106 ont une activité chitinolytique significativement supérieure à celle de l'extrait de plantes de tabac-témoin. La sélection sur acide oxalique permet donc d'obtenir des plantes exprimant un gène d'intérêt, en

l'occurrence le gène hybride codant pour une protéine à activité chitinase décrit dans la demande de brevet WO 92/01792.

## LISTE DE SEQUENCES

## (1) INFORMATION GENERALE:

5

## (i) DEPOSANT:

- (A) NOM: ELF SANOFI
- (B) RUE: 32-34 rue Marbeuf
- (C) VILLE: PARIS
- 10 (E) PAYS: France
- (F) CODE POSTAL: 75008
- (G) TELEPHONE: 40.73.40.73
- (H) TELECOPIE: 40.73.23.84

15

- (A) NOM: SOCIETE NATIONALE ELF AQUITAINE

- (B) RUE: Tour Elf-002 Place de la Coupole LA DEFENSE 6

- (C) VILLE: COURBEVOIE

- (E) PAYS: France

- (F) CODE POSTAL: 92400

20

- (G) TELEPHONE: 47.44.45.46

(ii) TITRE DE L' INVENTION: Utilisation d'une séquence d'ADN codant pour une protéine susceptible de dégrader l'acide oxalique à titre de gène de sélection

25

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 20

## (iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

30

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk

- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible

- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS

- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

## (vi) DONNEES DE LA DEMANDE ANTERIEURE:

35

- (A) NUMERO DE DEPOT: FR 92 14721

- (B) DATE DE DEPOT: 07-DEC-1992

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 224 acides aminés

5 (B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

## 10 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

Met Gly Tyr Ser Lys Thr Leu Val Ala Gly Leu Phe Ala Met Leu Leu  
1 5 10 15

15 Leu Ala Pro Ala Val Leu Ala Thr Asp Pro Asp Pro Leu Gln Asp Phe  
20 25 30

20 Cys Val Ala Asp Leu Asp Gly Lys Ala Val Ser Val Asn Gly His Thr  
35 40 45

Cys Lys Pro Met Ser Glu Ala Gly Asp Asp Phe Leu Phe Ser Ser Lys  
50 55 60

25 Leu Ala Lys Ala Gly Asn Thr Ser Thr Pro Asn Gly Ser Ala Val Thr  
65 70 75 80

Glu Leu Asp Val Ala Glu Trp Pro Gly Thr Asn Thr Leu Gly Val Ser  
85 90 95

30 Met Asn Arg Val Asp Phe Ala Pro Gly Gly Thr Asn Pro Pro His Ile  
100 105 110

His Pro Arg Ala Thr Glu Ile Gly Ile Val Met Lys Gly Glu Leu Leu  
115 120 125

35 Val Gly Ile Leu Gly Ser Leu Asp Ser Gly Asn Lys Leu Tyr Ser Arg  
130 135 140

	Val Val Arg Ala Gly Glu Thr Phe Leu Ile Pro Arg Gly Leu Met His		
145	150	155	160
	Phe Gln Phe Asn Val Gly Lys Thr Glu Ala Ser Met Val Val Ser Phe		
5	165	170	175
	Asn Ser Gln Asn Pro Gly Ile Val Phe Val Pro Leu Thr Leu Phe Gly		
	180	185	190
10	Ser Asn Pro Pro Ile Pro Thr Pro Val Leu Thr Lys Ala Leu Arg Val		
	195	200	205
	Glu Ala Arg Val Val Glu Leu Leu Lys Ser Lys Phe Ala Ala Gly Phe		
15	210	215	220

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

20 (A) LONGUEUR: 672 paires de bases  
 (B) TYPE: acide nucléique  
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

25 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

30	ATGGGGTACT CCAAAACCT AGTAGCTGGC GTGTTCGCAA TGCTGTTACT AGCTCCGGCC	60
	GTCTTGGCCA CCGACCCAGA CCCTCTCCAG GACTTCTGTG TCGCCGACCT CGACGGCAAG	120
	GCGGTCTCGG TGAACGGCA CACGTGCAAG CCCATGTGG AGGCCGGCGA CGACTTCCTC	180
35	TTCTCGTCCA AGTTGGCAA GGCCGGCAAC ACGTCCACCC CGAACGGCTC CGCCGTGACG	240
	GAGCTCGACG TGGCCGAGTG GCCCGGTACC AACACGCTGG GTGTGTCAT GAACCGCGTG	300

	GACTTTGCTC CGGGAGGCAC CAACCCACCA CACATCCACC CGCGTGCCAC CGAGATCGGC	360
	ATCGTGATGA AAGGTGAGCT TCTCGTGGGA ATCCTTGGCA GCCTCGACTC CGGGAAACAAG	420
5	CTCTACTCGA GGGTGGTGCG CGCCGGAGAG ACGTTCCCTCA TCCCACGGGG CCTCATGCAC	480
	TTCCAGTTCA ACGTCGGTAA GACCGAGGCC TCCATGGTCG TCTCCTCAA CAGCCAGAAC	540
	CCCGGCATTG TCTTCGTGCC CCTCACGCTC TTGGCTCCA ACCCGCCCAT CCCAACGCG	600
10	GTGCTCACCA AGGCACTCCG GGTGGAGGCC AGGGTCGTGG AACTTCTCAA GTCCAAGTTT	660
	GCCGCTGGGT TT	672

15 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 254 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(B) CONFIgURATION: Lineaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3.

25

Gly Gly Asp Leu Gly Ser Val Ile Ser Asn Ser Met Phe Asp Gln Met

1                    5                    10                    15

30                    Leu Lys His Arg Asn Glu Asn Ser Cys Gln Gly Lys Asn Asn Phe Tyr  
                       20                    25                    30

Ser Tyr Asn Ala Phe Ile Thr Ala Ala Arg Ser Phe Pro Gly Phe Gly  
35 40 45

35           Thr Ser Gly Asp Ile Asn Ala Arg Lys Arg Glu Ile Ala Ala Phe Phe  
              50                   55                   60

Ala Gln Thr Ser His Glu Thr Thr Gly Gly Trp Pro Ser Ala Pro Asp  
65 70 75 80

Gly Pro Phe Ala Trp Gly Tyr Cys Phe Leu Arg Glu Arg Gly Asn Pro  
5 85 90 95

Gly Asp Tyr Cys Ser Pro Ser Ser Gln Trp Pro Cys Ala Pro Gly Arg  
100 105 110

Lys Tyr Phe Gly Arg Gly Pro Ile Gln Ile Ser His Asn Tyr Asn Tyr  
115 120 125

Gly Pro Cys Gly Arg Ala Ile Gly Val Asp Leu Leu Asn Asn Pro Asp  
130 135 140

15 Leu Val Ala Thr Asp Pro Val Ile Ser Phe Lys Thr Ala Ile Trp Phe  
145 150 155 160

Trp Met Thr Pro Gln Ser Pro Lys Pro Ser Cys His Asp Val Ile Ile  
20 165 170 175

Gly Arg Trp Asn Pro Ser Ala Gly Asp Arg Ser Ala Asn Arg Leu Pro  
180 185 190

Gly Phe Gly Val Ile Thr Asn Ile Ile Asn Gly Gly Leu Glu Cys Gly  
25 195 200 205

Arg Gly Asn Asp Asn Arg Val Gln Asp Arg Ile Gly Phe Tyr Arg Arg  
210 215 220

Tyr Cys Gly Ile Leu Gly Val Ser Pro Gly Asp Asn Leu Asp Cys Gly  
30 225 230 235 240

Asn Gln Arg Ser Phe Gly Asn Gly Leu Leu Val Asp Thr Met  
35 245 250

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

5                   (A) LONGUEUR: 24 acides aminés  
                 (B) TYPE: acide aminé  
                 (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

## 10               (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

Met Arg Arg Thr Ser Lys Leu Thr Thr Phe Ser Leu Leu Phe Ser Leu

1                   5                   10                   15

15               Val Leu Leu Ser Ala Ala Leu Ala  
                 20

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

## 20               (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

                 (A) LONGUEUR: 51 acides aminés  
                 (B) TYPE: acide aminé  
                 (D) CONFIGURATION: linéaire

## 25               (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

Gln Asn Cys Gly Ser Gln Gly Gly Gly Lys Val Cys Ala Ser Gly Gln  
30               1                   5                   10                   15

Cys Cys Ser Lys Phe Gly Trp Cys Gly Asn Thr Asn Asp His Cys Gly  
20               25                   30

35               Ser Gly Asn Cys Gln Ser Gln Cys Pro Gly Gly Pro Gly Pro Gly  
                 35                   40                   45

Pro Val Thr

50

5 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1153 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- 10 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

15 (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: intron
- (B) EMPLACEMENT: 443..521

20 (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: intron
- (B) EMPLACEMENT: 676..756

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

25	ATGAGGCGAA CTTCTAAATT GACTACTTTT TCTTTGCTGT TTTCTCTGGT TTTGCTGAGT	60
	GCTGCCTTGG CACAGAATTG TGGITCACAG GGCGGAGGCA AAGTTTGTC GTCGGGACAA	120
30	TGTTGCAGCA AATTCCGGTG GTGCCGTAAC ACTAATGACC ATTGTGGTTC TGGCAATTGT	180
	CAAAGTCAGT GTCCAGGTGG CGGCCCTGGT CCTGGTCCTG TTACTGGTGG GGACCTCGGA	240
35	AGCGTCATCT CAAATTCTAT GTTTGATCAA ATGCTTAAGC ATCGTAACGA AAATTCTTGT	300
	CAAGGAAAGA ATAATTCTA CAGTTACAAT GCCTTTATTA CTGCTGCTAG GTCTTTCCCT	360
	GGCTTTGGTA CAAGTGGTGA TATCAATGCC CGTAAAAGGG AAATTGCTGC TTTCTTTGCC	420

	CAAACCTCCC ATGAAACTAC TGGTATGTGT ATAACCATT ACATCGAAC ATTAAAATAT	480
	AATTTCATTT TATTTTATTT AGTAATTGAT TATATATGTA GGAGGATGGC CTTCCGCACC	540
5	TGATGGACCA TTTCGATGGG GTTACTGTT CCTTAGAGAA CGAGGTAACC CCGGTGACTA	600
	CTGTCACCA AGTAGTCAAT GCCCTTGCC ACCTGGAAGG AAATATTTCG GACGAGGCC	660
	AATCCAAATT TCACAGTAAG CTACATAAAT CTATATATGG TAAAATTTGA TGAACTTGT	720
10	GTTGCTAATT ACGTGTATT TGACATTCA AACAGCAAC TACAACATAG GGCCATGTGG	780
	AAGAGCCATC GGAGTGGACC TTTAAACAA TCCTGATTAA GTAGCCACAG ACCCAGTCAT	840
15	CTCATTCAG ACTGCTATCT GGTTCTGGAT GACCCCTCAA TCACCAAAGC CTTCTTGCCA	900
	CGATGTCATC ATTGGAAGAT GGAACCCATC TGCGGTGAC CGATCAGCCA ATCGTCTTCC	960
	TGGATTTGGT GTCATCACAA ACATCATCAA TGGGGCCTG GAATGTGGTC GTGGCAATGA	1020
20	CAATAGGGTC CAGGATCGCA TTGGGTTTA CAGGAGGTAT TGCGGTATTG TTGGTGTAG	1080
	TCCTGGTGAC AATCTTGATT GCGGAAACCA GAGATTTTG GGAAACGGAC TTTAGTCGA	1140
25	TACTATGTAA TGA	1153

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 7:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

30 (A) LONGUEUR: 389 acides aminés  
 (B) TYPE: acide aminé  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

35 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

Gly Ser Gly Phe Ala Asn Ala Val Tyr Phe Thr Asn Trp Gly Ile Tyr  
1 5 10 15

Gly Arg Asn Phe Gln Pro Ala Asp Leu Pro Ala Ser Glu Ile Thr His  
5 20 25 30

Val Leu Tyr Ser Phe Met Asn Val Arg Ala Asp Gly Thr Ile Phe Ser  
35 40 45

Gly Asp Thr Tyr Ala Asp Tyr Glu Lys His Tyr Ala Gly Asp Ser Trp  
10 50 55 60

Asn Asp Val Gly Thr Asn Ala Tyr Gly Cys Val Lys Gln Leu Tyr Leu  
15 65 70 75 80

Leu Lys Lys Gln Asn Arg Asn Met Lys Val Met Leu Ser Ile Gly Gly  
20 85 90 95

Trp Thr Trp Ser Thr Asn Phe Pro Ala Ala Ala Ser Ser Ala Ala Thr  
100 105 110

Arg Lys Thr Phe Ala Gln Ser Ala Val Gly Phe Met Lys Asp Trp Gly  
115 120 125

Phe Asp Gly Ile Asp Ile Asp Trp Glu Tyr Pro Ala Asp Ala Thr Gln  
25 130 135 140

Ala Gln Asn Met Val Leu Leu Leu Gln Ala Val Arg Ser Glu Leu Asp  
30 145 150 155 160

Ser Tyr Ala Ala Gln Tyr Ala Lys Gly His His Phe Leu Leu Ser Ile  
165 170 175

Ala Ala Pro Ala Gly Pro Asp Asn Tyr Asn Lys Leu Lys Phe Ala Glu  
35 180 185 190

Leu Gly Lys Val Leu Asp Tyr Ile Asn Leu Met Ala Tyr Asp Tyr Ala  
195 200 205

Gly Ser Trp Ser Asn Tyr Thr Gly His Asp Ala Asn Ile Tyr Ala Asn  
210 215 220

5 Pro Gln Asn Pro Asn Ala Thr Pro Tyr Asn Thr Asp Asp Ala Val Gln  
225 230 235 240

Ala Tyr Ile Asn Gly Gly Val Pro Ala Asn Lys Ile Val Leu Gly Met  
245 250 255

10 Pro Ile Tyr Gly Arg Ser Phe Gln Gln Thr Glu Gly Ile Gly Lys Pro  
260 265 270

Tyr Asn Gly Ile Gly Ser Gly Ser Trp Glu Asn Gly Ile Trp Asp Tyr  
15 275 280 285

Lys Ala Leu Pro Lys Ala Gly Ala Thr Val Lys Cys Asp Asp Thr Ala  
290 295 300

20 Lys Gly Cys Tyr Ser Tyr Asp Pro Ser Thr Lys Glu Leu Ile Ser Phe  
305 310 315 320

Asp Thr Pro Ala Met Ile Ser Thr Lys Val Ser Trp Leu Lys Gly Lys  
25 325 330 335

Gly Leu Gly Gly Ser Met Phe Trp Glu Ala Ser Ala Asp Lys Lys Gly  
340 345 350

Ser Asp Ser Leu Ile Ser Thr Ser His Gln Gly Leu Gly Ser Gln Asp  
30 355 360 365

Ser Thr Gln Asn Tyr Leu Asp Tyr Pro Asn Ser Lys Tyr Asp Asn Ile  
370 375 380

35 Lys Lys Gly Met Asn  
385

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

5 (A) LONGUEUR: 22 acides aminés  
(B) TYPE: acide aminé  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

10 (vii) SOURCE IMMEDIATE:

(B) CLONE: signal peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

15 Met Leu Ser Phe Val Lys Lys Ser Ile Ala Leu Val Ala Ala Leu Gln  
1 5 10 15

Ala Val Thr Ala Leu Ala

20

20

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

25 (A) LONGUEUR: 12 acides aminés  
(B) TYPE: acide aminé  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

30 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

Thr Pro Ile Ser Ser Glu Ala Gly Val Glu Lys Arg  
1 5 10

35 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 1167 paires de bases

- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

5 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

	GGTAGTGGTT TTGCAAATGC CGTCTACTTC ACCAACTGGG GCATTTATGG CCGCAACTTC	60
10	CAGCCTGCCG ACCTTCCTGC CTCGGAGATT ACTCACGTAC TCTACTCCTT CATGAATGTC	120
	CGCGCAGATG GCACCATCTT TTCCGGTGAT ACCTATGCCG ACTACGAGAA GCACTACGCT	180
15	GGTGAECTCTT GGAACGATGT GGGCACGAAC GCTTACGGTT GTGTTAAGCA ACTTTATCTT	240
	CTCAAGAACG AGAACCGCAA CATGAAGGTG ATGCTGTCGA TTGGTGGTTG GACATGGTCT	300
20	ACCAACTTCC CCGCTGCCGC CAGCTGGCT GCTACCCGAA AGACTTTGCA TCAGTCTGCT	360
	GTTGGCTTCA TGAAGGACTG GGGTTTCGAC GGTATTGATA TCGACTGGGA GTACCCGCC	420
	GATGCCACTC AGGCTCAGAA TATGGTTCTC TTGCTACAGG CTGTCCGCAG TGAGCTCGAC	480
25	TCCTACGCTG CCCAGTACGC CAAGGGTCAC CACTTCCTGC TTCAATTGC CGCCCCCTGCT	540
	GGACCTGACA ATTATAACAA GCTGAAGTTT GCTGAGCTTG GCAAGGTTCT CGATTACATT	600
30	AACCTCATGG CTTACGATTA CGCTGGATCT TGGAGCAACT ACACGGCCA CGATGCCAAC	660
	ATATACGCAA ACCCGCAGAA CCCCAACGCC ACCCCTTACA ACACGGACGA TGCTGTCCAG	720
	GCCTATATCA ACGGCGGCGT CCCTGCCAAC AAGATCGTCC TTGGTATGCC AATCTACGGC	780
35	CGATCCTTCC AGCAAACCGA GGGTATCGGT AAGCCTTACA ATGGTATTGG CTCTGGTAGC	840
	TGGGAGAACG GTATCTGGGA CTACAAGGCT CTCCCCAAGG CTGGTGCCAC CGTCAAGTGC	900

GACGATACCG	CCAAGGGATG	CTACAGCTAC	GATCCAAGCA	CTAAGGAGCT	TATTTCTTTC	960	
GATAACGCCGG	CTATGATCAG	CACCAAAGTT	AGCTGGCTCA	AGGGCAAGGG	CCTTGGCGGC	1020	
5	AGCATGTTCT	GGGAGGCTTC	TGCCGACAAG	AAGGGCTCGG	ACTCTCTTAT	TAGCACCAGC	1080
CACCAAGGTC	TCGGTAGCCA	GGACAGCACT	CAGAACTACC	TCGACTACCC	TAACTCCAAG	1140	
TACGACAAACA	TCAAGAAGGG	CATGAAC				1167	

(2) INFORMATION POUR LA SEQ TD NO: 11:

(i) CARACTÉRISTIQUES DE LA SÉQUENCE.

(A) LONGUEUR: 309 acides aminés  
(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

20

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

25

Ile Gly Val Cys Tyr Gly Met Leu Gly Asn Asn Leu Pro Ser Ala Asn  
1 5 10 15

Asp Val Ile Gly Leu Tyr Arg Ser Asn Asn Ile Lys Arg Met Arg Leu  
20 25 30

Tyr Asp Pro Asn Gln Ala Ala Leu Glu Ala Leu Arg Asn Ser Gly Ile  
 35                          40                          45

Glu Leu Ile Leu Gly Val Pro Asn Ser Asp Leu Gln Gly Leu Ala Thr  
 50                    55                    60

35

Asn Pro Asp Thr Ser Arg Gln Trp Val Gln Lys Asn Val Leu Asn Phe  
65 70 75 . . 80

Trp Pro Ser Val Lys Ile Lys Tyr Val Ala Val Gly Asn Glu Val Ser  
85 90 95

5 Pro Val Gly Gly Ser Ser Ser Val Ala Gln Tyr Val Leu Pro Ala Ile  
100 105 110

Gln Asn Val Tyr Gln Ala Ile Arg Ala Gln Gly Leu His Asp Gln Ile  
115 120 125

10 Lys Val Ser Thr Ser Ile Asp Met Thr Leu Ile Gly Asn Ser Phe Pro  
130 135 140

Pro Ser Gln Gly Ser Phe Arg Gly Asp Val Arg Ser Tyr Leu Asp Pro  
145 150 155 160

15 Ile Ile Gly Tyr Leu Val Tyr Ala Asn Ala Pro Leu Leu Val Asn Val  
165 170 175

20 Tyr Pro Tyr Phe Ser Tyr Thr Gly Asn Pro Arg Asp Ile Ser Leu Pro  
180 185 190

Tyr Ala Leu Phe Thr Ala Pro Asn Val Val Val Trp Asp Gly Gln Tyr  
195 200 205

25 Gly Tyr Gln Asn Leu Phe Asp Ala Met Leu Asp Ser Val His Ala Ala  
210 215 220

Ile Asp Asn Thr Lys Ile Gly Tyr Val Glu Val Val Val Ser Glu Ser  
225 230 235 240

30 35 Gly Trp Pro Ser Asp Gly Gly Phe Ala Ala Thr Tyr Asp Asn Ala Arg  
245 250 255

Val Tyr Leu Asp Asn Leu Val Arg Arg Ala Asn Arg Gly Ser Pro Arg  
260 265 270

Arg Pro Ser Lys Pro Thr Glu Thr Tyr Ile Phe Ala Met Phe Asp Glu  
275 280 285

Asn Gln Lys Asn Pro Glu Ile Glu Lys His Phe Gly Leu Phe Asn Pro  
290 295 300

5 Asn Lys Gln Lys Lys  
305

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 12:

**10 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SÉQUENCE**

- (A) LONGUEUR: 28 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

**15 (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide**

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12

20 Tyr Pro Phe Gly Phe Gly Gly Lys Arg Leu Gly Lys Val Val Ile Asp  
           1                 5                           10                         15

Asp Phe Asn Ala Thr Thr Ser Ile Lys Ser Asp Val  
20 25

25 (2) INFORMATION POUR LA SEO ID NO: 12.

(i) CARACTÉRISTIQUES DE LA SÉQUENCE

(A) LONGUEUR: 338 acides aminés  
 (B) TYPE: acide aminé  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12.

35

Gln Ile Gly Val Cys Tyr Gly Met Leu Gly Asn Asn Leu Pro Ser Ala  
 1                   5                   10                   15

Asn Asp Val Ile Gly Leu Tyr Arg Ser Asn Asn Ile Lys Arg Met Arg  
20 25 30

Leu Tyr Asp Pro Asn Gln Ala Ala Leu Glu Ala Leu Arg Asn Ser Gly  
5 35 40 45

Ile Glu Leu Ile Leu Gly Val Pro Asn Ser Asp Leu Gln Gly Leu Ala  
50 55 60

10 Thr Asn Pro Asp Thr Ser Arg Gln Trp Val Gln Lys Asn Val Leu Asn  
65 70 75 80

Phe Trp Pro Ser Val Lys Ile Lys Tyr Val Ala Val Gly Asn Glu Val  
15 85 90 95

Ser Pro Val Gly Gly Ser Ser Ser Val Ala Gln Tyr Val Leu Pro Ala  
100 105 110

Ile Gln Asn Val Tyr Gln Ala Ile Arg Ala Gln Gly Leu His Asp Gln  
20 115 120 125

Ile Lys Val Ser Thr Ser Ile Asp Met Thr Leu Ile Gly Asn Ser Phe  
130 135 140

25 Pro Pro Ser Gln Gly Ser Phe Arg Gly Asp Val Arg Ser Tyr Leu Asp  
145 150 155 160

Pro Ile Ile Gly Tyr Leu Val Tyr Ala Asn Ala Pro Leu Leu Val Asn  
30 165 170 175

Val Tyr Pro Tyr Phe Ser Tyr Thr Gly Asn Pro Arg Asp Ile Ser Leu  
180 185 190

35 Pro Tyr Ala Leu Phe Thr Ala Pro Asn Val Val Val Trp Asp Gly Gln  
195 200 205

Tyr Gly Tyr Gln Asn Leu Phe Asp Ala Met Leu Asp Ser Val His Ala  
210 215 220

Ala Ile Asp Asn Thr Lys Ile Gly Tyr Val Glu Val Val Val Ser Glu  
225 230 235 240

5 Ser Gly Trp Pro Ser Asp Gly Gly Phe Ala Ala Thr Tyr Asp Asn Ala  
245 250 255

Arg Val Tyr Leu Asp Asn Leu Val Arg Arg Ala Asn Arg Gly Ser Pro  
260 265 270

10 Arg Arg Pro Ser Lys Pro Thr Glu Thr Tyr Ile Phe Ala Met Phe Asp  
275 280 285

Glu Asn Gln Lys Asn Pro Glu Ile Glu Lys His Phe Gly Leu Phe Asn  
15 290 295 300

Pro Asn Lys Gln Lys Lys Tyr Pro Phe Gly Phe Gly Gly Lys Arg Leu  
305 310 315 320

20 Gly Lys Val Val Ile Asp Asp Phe Asn Ala Thr Thr Ser Ile Lys Ser  
325 330 335

Asp Val

25

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 14:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

30 (A) LONGUEUR: 32 acides aminés  
(B) TYPE: acide aminé  
(D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

## 35 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:

Met Pro Ser Leu Phe Ala Arg Asn Gln Arg Phe Ser Leu Ala Thr Leu  
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Glu Leu Leu Thr Gly Asn Leu Arg Met Ala Asp Ala

20

25

30

5 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 15:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 927 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- 10 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

15 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:

ATTGGTGTGT	GTTATGGCAT	GCTGGGCAAC	AATCTACCGT	CAGCAAACGA	TGTTATAGGT	60
20 CTTTATAGAT	CAAATAACAT	AAAGAGAATG	AGACTCTATG	ATCCTAACATCA	AGCTGCTCTA	120
GAAGCACTTA	GAAATTCTGG	CATTGAACTC	ATTCTTGGGG	TGCCAAACTC	TGACCTTCAA	180
25 GGCCTTGCCA	CCAATCCTGA	CACTTCTCGT	CAATGGGTGC	AAAAAAACGT	GTTGAACTTT	240
TGGCCTAGTG	TCAAAATCAA	GTACGTGGCA	GTTGGAAATG	AACTGAGTCC	CGTTGGAGGC	300
30 TCTTCTTCGG	TAGCCCATA	TGTTCTACCT	GCCATCCAAA	ATGTATACCA	AGCAATAAGA	360
GCTCAAGGCC	TTCATGATCA	AATCAAGGTT	TCAACATCTA	TTGACATGAC	CCTAACATAGGA	420
AACTCTTTC	CTCCATCGCA	AGGTTCTTC	AGGGGTGATG	TGAGATCATA	CCTAGATCCC	480
35 ATAATTGGGT	ACTTGGTATA	TGCAAATGCA	CCATTACTAG	TCAATGTGTA	CCCTTATTTT	540
AGTTACACTG	GTAACCCCCG	TGACATATCA	CTTCCCTATG	CTCTTTAC	AGCACCAAAT	600
GTTGTGGTAT	GGGATGGTCA	ATATGGGTAC	CAAAATTGT	TTGATGCTAT	GTTGGATTCA	660

	GTACATGCAG CCATTGATAA CACTAAGATT GGTTATGTGG AGGTGTTGT ATCCGAGAGT	720
	GGGTGGCCAT CAGATGGAGG ATTTGCTGCC ACTTATGACA ACGCACGGCT GTACTTAGAC	780
5	AATTTGGITC GTCGTGCTAA TAGAGGAAGC CCAAGAAGGC CTTCGAAGCC CACTGAGACT	840
	TATATATTTG CCATGTTCGA TGAAAATCAA AAAAATCCAG AGATAGAGAA ACATTTGGG	900
	CTCTTCAATC CCAACAAACA AAAAAAAA	927
10		

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 16:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 751 paires de bases
- 15 (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

20 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

## (vii) SOURCE IMMEDIATE:

- (B) CLONE: gf-2.8 de la germe de blé

## 25 (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMPLACEMENT: 21..692

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:

30 AAGCTTATTA CATAGCAAGC ATG GGG TAC TCC AAA ACC CTA GTA GCT GGC  
Met Gly Tyr Ser Lys Thr Leu Val Ala Gly

1	5	10
---	---	----

35 GTG TTC GCA ATG CTG TTA CTA GCT CCG GCC GTC TTG GCC ACC GAC CCA  
Val Phe Ala Met Leu Leu Ala Pro Ala Val Leu Ala Thr Asp Pro

15	20	25
----	----	----

GAC CCT CTC CAG GAC TTC TGT GTC GCC GAC CTC GAC GGC AAG GCG GTC      146  
 Asp Pro Leu Gln Asp Phe Cys Val Ala Asp Leu Asp Gly Lys Ala Val  
 30                35                40

5    TCG GTG AAC GGG CAC ACG TGC AAG CCC ATG TCG GAG GCC GGC GAC GAC      194  
 Ser Val Asn Gly His Thr Cys Lys Pro Met Ser Glu Ala Gly Asp Asp  
 45                50                55

TTC CTC TTC TCG TCC AAG TTG GCC AAG GCC GGC AAC ACG TCC ACC CCG      242  
 10   Phe Leu Phe Ser Ser Lys Leu Ala Lys Ala Gly Asn Thr Ser Thr Pro  
 60                65                70

AAC GGC TCC GCC GTG ACG GAG CTC GAC GTG GCC GAG TGG CCC GGT ACC      290  
 Asn Gly Ser Ala Val Thr Glu Leu Asp Val Ala Glu Trp Pro Gly Thr  
 15   75            80                85                90

AAC ACG CTG GGT GTG TCC ATG, AAC CGC GTG GAC TTT GCT CCC GGA GGC      338  
 Asn Thr Leu Gly Val Ser Met Asn Arg Val Asp Phe Ala Pro Gly Gly  
 20                95                100                105

ACC AAC CCA CCA CAC ATC CAC CCG CGT GCC ACC GAG ATC GGC ATC GTG      386  
 Thr Asn Pro Pro His Ile His Pro Arg Ala Thr Glu Ile Gly Ile Val  
 110               115                120

25   ATG AAA GGT GAG CTT CTC GTG GGA ATC CTT GGC AGC CTC GAC TCC GGG      434  
 Met Lys Gly Glu Leu Leu Val Gly Ile Leu Gly Ser Leu Asp Ser Gly  
 125               130                135

AAC AAG CTC TAC TCG AGG GTG GTG CGC GCC GGA GAG ACG TTC CTC ATC      482  
 30   Asn Lys Leu Tyr Ser Arg Val Val Arg Ala Gly Glu Thr Phe Leu Ile  
 140               145                150

CCA CGG GGC CTC ATG CAC TTC CAG TTC AAC GTC GGT AAG ACC GAG GCC      530  
 Pro Arg Gly Leu Met His Phe Gln Phe Asn Val Gly Lys Thr Glu Ala  
 35   155            160                165                170

TCC ATG GTC GTC TCC TTC AAC AGC CAG AAC CCC GGC ATT GTC TTC GTG      578  
 Ser Met Val Val Ser Phe Asn Ser Gln Asn Pro Gly Ile Val Phe Val

175

180

185

CCC CTC ACG CTC TTC GGC TCC AAC CCG CCC ATC CCA ACG CCG GTG CTC  
 Pro Leu Thr Leu Phe Gly Ser Asn Pro Pro Ile Pro Thr Pro Val Leu  
 5 190 195 200

ACC AAG GCA CTC CGG GTG GAG GCC AGG GTC GTG GAA CTT CTC AAG TCC  
 Thr Lys Ala Leu Arg Val Glu Ala Arg Val Val Glu Leu Leu Lys Ser  
 10 205 210 215

AAG TTT GCC GCT GGG TTT TAATTTCTAG GAGCCTTCCC TGAAATGATA  
 Lys Phe Ala Ala Gly Phe  
 220

15 ATTATATAAT TCCATATATG CATGCTAGC 751

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 17:

20 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 224 acides aminés  
 (B) TYPE: acide aminé  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

25 (ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 17:

Met Gly Tyr Ser Lys Thr Leu Val Ala Gly Val Phe Ala Met Leu Leu  
 1 5 10 15

30 Leu Ala Pro Ala Val Leu Ala Thr Asp Pro Asp Pro Leu Gln Asp Phe  
 20 25 30

Cys Val Ala Asp Leu Asp Gly Lys Ala Val Ser Val Asn Gly His Thr  
 35 35 40 45

Cys Lys Pro Met Ser Glu Ala Gly Asp Asp Phe Leu Phe Ser Ser Lys  
 50 55 60

Leu Ala Lys Ala Gly Asn Thr Ser Thr Pro Asn Gly Ser Ala Val Thr  
65 70 75 80

5 Glu Leu Asp Val Ala Glu Trp Pro Gly Thr Asn Thr Leu Gly Val Ser  
85 90 95

Met Asn Arg Val Asp Phe Ala Pro Gly Gly Thr Asn Pro Pro His Ile  
100 105 110

10 His Pro Arg Ala Thr Glu Ile Gly Ile Val Met Lys Gly Glu Leu Leu  
115 120 125

Val Gly Ile Leu Gly Ser Leu Asp Ser Gly Asn Lys Leu Tyr Ser Arg  
15 130 135 140

Val Val Arg Ala Gly Glu Thr Phe Leu Ile Pro Arg Gly Leu Met His  
145 150 155 160

20 Phe Gln Phe Asn Val Gly Lys Thr Glu Ala Ser Met Val Val Ser Phe  
165 170 175

Asn Ser Gln Asn Pro Gly Ile Val Phe Val Pro Leu Thr Leu Phe Gly  
180 185 190

25 Ser Asn Pro Pro Ile Pro Thr Pro Val Leu Thr Lys Ala Leu Arg Val  
195 200 205

Glu Ala Arg Val Val Glu Leu Leu Lys Ser Lys Phe Ala Ala Gly Phe  
30 210 215 220

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 18:

35 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 38 acides aminés  
(B) TYPE: acide aminé  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 18:

5 Thr Asp Pro Asp Pro Leu Gln Asp Phe Xaa Val Ala Asp Leu Asp Gly  
 1 5 10 15

Lys Ala Val Ser Val Asn Gly His Thr Xaa Lys Pro Met Ser Glu Ala  
20 25 30  
10  
Gly Asp Asp Phe Leu Phe  
35

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 18:

15

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 9 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO 10

25 Ala Gly Glu Thr Phe Val Ile Pro Arg  
1

(2) INFORMATION DOLUE LA GPO DU 10 JUIN

30 [View](#) [Edit](#)

(A) LONGUEUR: 10 paires de base

- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

35

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

WO 94/13790

PCT/FR93/01203

54

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 20:

AGCTGGATCC

10

## **REVENDICATIONS**

5            1. Utilisation d'une séquence d'ADN codant pour une protéine susceptible de dégrader l'acide oxalique à titre d'agent de sélection de cellules végétales.

10          2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite séquence d'ADN est associée à une séquence d'intérêt.

15          3. Utilisation selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que la protéine susceptible de dégrader l'acide oxalique est une enzyme à activité oxydase.

20          4. Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que l'enzyme à activité oxydase est l'oxalate oxydase de séquence [SEQ ID N° 1] ci-après ou une séquence présentant un degré d'homologie élevé avec la séquence [SEQ ID N° 1] ci-après :

	Met	Gly	Tyr	Ser	Lys	Thr	Leu	Val	Ala	Gly	Leu	Phe	Ala	Met	Leu	Leu
1			5							10				15		
20	Leu	Ala	Pro	Ala	Val	Leu	Ala	Thr	Asp	Pro	Asp	Pro	Leu	Gln	Asp	Phe
			20					25					30			
	Cys	Val	Ala	Asp	Leu	Asp	Gly	Lys	Ala	Val	Ser	Val	Asn	Gly	His	Thr
			35				40					45				
25	Cys	Lys	Pro	Met	Ser	Glu	Ala	Gly	Asp	Asp	Phe	Leu	Phe	Ser	Ser	Lys
			50			55					60					
	Leu	Ala	Lys	Ala	Gly	Asn	Thr	Ser	Thr	Pro	Asn	Gly	Ser	Ala	Val	Thr
			65		70					75			80			
	Glu	Leu	Asp	Val	Ala	Glu	Trp	Pro	Gly	Thr	Asn	Thr	Leu	Gly	Val	Ser
				85				90				95				
30	Met	Asn	Arg	Val	Asp	Phe	Ala	Pro	Gly	Gly	Thr	Asn	Pro	Pro	His	Ile
				100				105				110				
	His	Pro	Arg	Ala	Thr	Glu	Ile	Gly	Ile	Val	Met	Lys	Gly	Glu	Leu	Leu
				115			120				125					
	Val	Gly	Ile	Leu	Gly	Ser	Leu	Asp	Ser	Gly	Asn	Lys	Leu	Tyr	Ser	Arg
35				130		135					140					
	Val	Val	Arg	Ala	Gly	Glu	Thr	Phe	Leu	Ile	Pro	Arg	Gly	Leu	Met	His
				145		150					155			160		

Phe Gln Phe Asn Val Gly Lys Thr Glu Ala Ser Met Val Val Ser Phe

165 170 175

Asn Ser Gln Asn Pro Gly Ile Val Phe Val Pro Leu Thr Leu Phe Gly

180 185 190

5 Ser Asn Pro Pro Ile Pro Thr Pro Val Leu Thr Lys Ala Leu Arg Val

195 200 205

Glu Ala Arg Val Val Glu Leu Leu Lys Ser Lys Phe Ala Ala Gly Phe

210 215 220

10 5. Utilisation selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que la séquence d'ADN codant pour une protéine susceptible de dégrader l'acide oxalique est la séquence [SEQ ID N°2] ci-après :

ATGGGGTACT CCAAAACCT AGTAGCTGGC CTGTTCGCAA TGCTGTTACT AGCTCCGGCC	60
15 GTCTTGGCCA CGCACCCAGA CCCTCTCCAG GACTTCTGTG TCGCCGACCT CGACGGCAAG	120
CGGGTCTCGG TGAACGGGCA CACGTGCAAG CCCATGTCGG AGGCCGGCGA CGACTTCCTC	180
TTCTCGTCCA AGTTGGCCAA GGCCGGCAAC ACGTCCACCC CGAACGGCTC CGCCGTGACG	240
GAGCTCGACG TGGCCGAGTG GCCCGGTACC AACACGCTGG GTGTGTCCAT GAACCGCGTG	300
GACTTTGCTC CCGGAGGCAC CAACCCACCA CACATCCACC CGCGTGCAC CGAGATCGGC	360
20 ATCGTGATGA AAGGTGAGCT TCTCGTGGGA ATCCTTGGCA GCCTCGACTC CGGGAACAAG	420
CTCTACTCGA GGGTGGTGCG CGCCGGAGAG ACGTTCCTCA TCCCACGGGG CCTCATGCAC	480
TTCCAGTTCA ACGTCGGTAA GACCGAGGCC TCCATGGTCG TCTCCTTCAA CAGCCAGAAC	540
CCCGGCATTG TCTTCGTGCC CCTCACGCTC TTCGGCTCCA ACCCGCCCCAT CCCAACGCCG	600
GTGCTCACCA AGGCACTCCG GGTGGAGGCC AGGGTCGTGG AACTTCTCAA GTCCAAGTTT	660
25 GCCGCTGGGT TT	672

6. Utilisation selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que la protéine susceptible de dégrader l'acide oxalique est une décarboxylase

30 7. Utilisation selon l'une des revendications 2 à 4, caractérisée en ce que la séquence d'intérêt code pour une protéine qui confère aux plantes une résistance aux agents pathogènes.

35 8. Utilisation selon la revendication 6, caractérisée en ce que la protéine d'intérêt est une protéine à activité endochitinase.

9. Procédé pour sélectionner sur acide oxalique des cals ou des plantes transformés par une séquence d'ADN codant pour une protéine susceptible de

dégrader l'acide oxalique, caractérisé en ce qu'il consiste à cultiver les cals ou les plantes sur un milieu de culture contenant de l'acide oxalique et du calcium en présence d'un agent chélateur ayant une affinité pour le calcium supérieure à celle de l'acide oxalique.

5

10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que ladite séquence d'ADN est associée à une séquence d'intérêt.
11. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que les agents chélateurs sont choisis parmi l'EDTA et l'EGTA.
12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 9 à 11 caractérisé en ce que les cals ou les plantes appartiennent à l'une des espèces Nicotiana tabacum, Helianthus annuus et Brassica napus.

15

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
 IPC 5 C12N9/02 C12N9/24 C12N15/53 C12N15/56 C12N15/82  
 //C12N5/10, A01H5/00, A01N63/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 IPC 5 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,92 14824 (IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES PLC) 3 September 1992 cited in the application see claims 1-20; figures 3-7 ---	1-12
A	WO,A,92 15685 (RHONE POULENC AGROCHEMIE) 17 September 1992 see page 1, line 1 - page 5, line 18 ---	1-12
A	WO,A,92 01792 (SANOFI) 6 February 1992 cited in the application see page 1, line 1 - page 8, line 19 ---	1-12

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- 'E' earlier document but published on or after the international filing date
- 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- '&' document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
17 February 1994	04-03-1994
Name and mailing address of the ISA  European Patent Office, P.B. 5818 Patentstaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Hornig, H

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>J. BIOL. CHEM. vol. 266, no. 16 , 5 June 1991 , AM. SOC. MOL. BIOL., INC., BALTIMORE, US; pages 10461 - 10469</p> <p>B.G. LANE ET AL. 'Homologies between members of the germin gene family in hexaploid wheat and similarities between these wheat germins and certain Physarum spherulins' cited in the application see page 10463, left column, line 35 - page 10465, right column, line 21; figure 4</p> <p>-----</p>	1-12

## Information on patent family members

PCT/FR 93/01203

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9214824	03-09-92	AU-A-	1207492	15-09-92
-----				
WO-A-9215685	17-09-92	FR-A-	2673644	11-09-92
		AU-A-	1682092	06-10-92
		CN-A-	1065683	28-10-92
		EP-A-	0531498	17-03-93
-----				
WO-A-9201792	06-02-92	FR-A-	2665177	31-01-92
		AU-A-	8302791	18-02-92
		CA-A-	2067176	25-01-92
		EP-A-	0493581	08-07-92
		JP-T-	5501807	08-04-93
-----				

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
**CIB 5 C12N9/02 C12N9/24 C12N15/53 C12N15/56 C12N15/82**  
 //C12N5/10, A01H5/00, A01N63/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
**CIB 5 C12N**

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERÉS COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO,A,92 14824 (IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES PLC) 3 Septembre 1992 cité dans la demande voir revendications 1-20; figures 3-7 ---	1-12
A	WO,A,92 15685 (RHONE POULENC AGROCHEMIE) 17 Septembre 1992 voir page 1, ligne 1 - page 5, ligne 18 ---	1-12
A	WO,A,92 01792 (SANOFI) 6 Février 1992 cité dans la demande voir page 1, ligne 1 - page 8, ligne 19 ---	1-12
	-/-	

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

17 Février 1994

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

04-03-1994

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patenttaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax. (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Hornig, H

C(uite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		no. des revendications visées
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	
A	<p>J. BIOL. CHEM. vol. 266, no. 16 , 5 Juin 1991 , AM. SOC. MOL. BIOL., INC., BALTIMORE, US; pages 10461 - 10469</p> <p>B.G. LANE ET AL. 'Homologies between members of the germin gene family in hexaploid wheat and similarities between these wheat germins and certain Physarum spherulins' cité dans la demande voir page 10463, colonne de gauche, ligne 35 - page 10465, colonne de droite, ligne 21; figure 4</p> <p>-----</p>	1-12

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication	
WO-A-9214824	03-09-92	AU-A-	1207492	15-09-92
WO-A-9215685	17-09-92	FR-A- AU-A- CN-A- EP-A-	2673644 1682092 1065683 0531498	11-09-92 06-10-92 28-10-92 17-03-93
WO-A-9201792	06-02-92	FR-A- AU-A- CA-A- EP-A- JP-T-	2665177 8302791 2067176 0493581 5501807	31-01-92 18-02-92 25-01-92 08-07-92 08-04-93